

**MULTIPLEX POLYNUCLEOTIDE CAPTURE METHODS AND COMPOSITIONS**

Publication number: JP2001503973 (T)

Publication date: 2001-03-27

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- International: C12N15/09; C12Q1/68; C12N15/09; C12Q1/68;  
(IPC1-7). C12Q1/68; C12N15/09

- European: C12Q1/68B10; C12Q1/68D2E; C12Q1/68D4; C12Q1/68E

Application number: JP19980516839T 19971002

Priority number(s): US19960027832P 19961004; US19970873437 19970612;  
WO1997US17705 19971002

Also published as:

WO9814610 (A2)

WO9814610 (A3)

US6124092 (A)

US6514699 (B1)

EP0929693 (A2)

more &gt;&gt;

Abstract not available for JP 2001503973 (T)

Abstract of corresponding document: WO 9814610 (A2)

The invention relates to methods and compositions for simultaneously generating a plurality of polynucleotide sequencing ladders or PCR amplification products. Each sequencing ladder is generated from a recoverable primer, i.e., an oligonucleotide primer comprising a recovery tag. The recovery tag may be an oligonucleotide. Each sequencing ladder has a unique recovery tag. After the generation of the multiple sequencing ladders, the different sequencing ladders are separated from one another, i.e., purified, by binding to recovery tag binding compounds that have been immobilized on one or more solid supports. The recovery tag binding compounds are immobilized on the solid support in an addressable manner, i.e., the recovery tag binding compounds have distinct locations on the solid support. The binding of the sequencing ladders to the recovery tag binding compounds serves to separate the different polynucleotide sequencing ladders present in a given solution. The separated sequencing ladders may then be released from the immobilized recovery tag binding compounds and subsequently resolved into individual components of the sequencing ladders or PCR products. The subject methods of separating sequencing ladders simultaneously generated in the same vessel may readily be adapted to separate a plurality of simultaneously generated polynucleotide amplification products. Other aspects of the invention are kits for the generation or recovery of a plurality of polynucleotide sequencing ladders or amplification products. The kits comprise a plurality of recoverable primers having unique recovery tags. Preferably, the recovery tags are polynucleotides that have substantially the same denaturation temperature when bound to appropriate recovery tag binding compounds, i.e., the primers comprise an integrated set. The kits may further comprise recovery tag binding compounds. The kits may further comprise labeled chain terminators. Other aspect of the invention include polynucleotide recovery devices.



Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(11)特許出願公表番号

特表2001-503973

(P2001-503973A)

(43)公表日 平成13年3月27日(2001.3.27)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F 1	デマゴート* (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A

審查請求 未請求 予備審查請求 有 (全 74 頁)

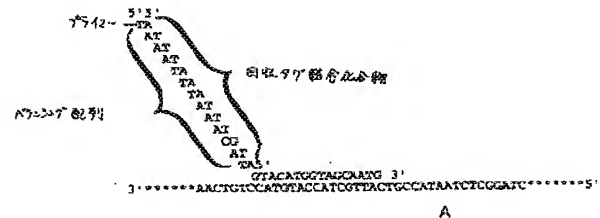
(21)出願番号	特願平10-516839	(71)出願人	ザ パーキン—エルマー コーポレイション
(86) (22)出願日	平成9年10月2日(1997.10.2)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404,
(85)翻訳文提出日	平成11年4月2日(1999.4.2)		フォスター シティ, リンカーン センター
(86)国際出願番号	PCT/US97/17705		ドライブ 850
(87)国際公開番号	WO98/14610	(72)発明者	オニール, ロジャー エイ.
(87)国際公開日	平成10年4月9日(1998.4.9)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070,
(31)優先権主張番号	60/027, 832		サン カルロス, メレンディー ドライブ
(32)優先日	平成8年10月4日(1996.10.4)		3180
(33)優先権主張国	米国(US)	(74)代理人	弁理士 山本 秀策
(31)優先権主張番号	08/873, 437		
(32)優先日	平成9年6月12日(1997.6.12)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

[最終頁に続く](#)

(54) 【発明の名称】 多重性ポリヌクレオチド捕獲方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、複数のポリヌクレオチド配列決定ラダーまたはPCR増幅産物を同時に生成するための方法及び組成に関する。各配列決定ラダーは回収可能なプライマー、すなわち、回収タグを含むオリゴヌクレオチドプライマーより生成される。回収タグはオリゴヌクレオチドであり得る。各配列決定ラダーはユニークな回収タグをもつ。複数の配列決定ラダーの生成後に、異なる配列決定ラダーは、1つかそれ以上の固相支持体上で固定されている回収タグ結合化合物への結合により、互いから分離、すなわち、精製される。回収タグ結合化合物は、アドレスを指定できる様式で固相支持体上に固定されている。すなわち、回収タグ結合化合物は、固相支持体上に異なった配置をする。回収タグ結合化合物への配列決定ラダーの結合は、所定の溶液中にある、異なるポリヌクレオチド配列決定ラダーを分離するのに役立つ。分離された配列決定ラダーは、次いで固定された回収タグ結合化合物から放出し得、続いて配列決定ラダーまたはPCR産物の各成分に分解される。同じ容器で同時に生成した配列決定ラダーを分離する本発明の方法は、複数の、



## 【特許請求の範囲】

1. 複数のポリヌクレオチド伸長産物を同時に生成する方法であって、該方法が、

複数のポリヌクレオチドテンプレートと複数の回収可能なプライマーとを混合する工程、

複数のポリヌクレオチド配列決定ラダーを生成する工程であって、ここで各伸長産物は回収可能なプライマーの一方に由来する、工程、

該伸長産物を、回収タグ結合化合物に結合させる工程であって、ここで回収タグを結合する化合物は、アドレスを指定できる様式で1つ以上の固相支持体に固定化されている、工程、

を包含する、方法。

2. 前記方法が、前記固相支持体から前記伸長産物を放出させる工程をさらに包含し、それによって複数の精製されたポリヌクレオチド伸長産物が產生される、請求項1に記載の方法。

3. 前記伸長産物が配列決定ラダーであり、そして前記テンプレートが配列決定テンプレートである、請求項1に記載の方法。

4. 前記方法が、前記固相支持体から前記伸長産物を放出させる工程をさらに包含し、それによって複数の精製されたポリヌクレオチド配列決定ラダーが產生される、請求項3に記載の方法。

5. 前記回収タグがオリゴヌクレオチドである、請求項3に記載の方法。

6. 少なくとも1つの前記回収タグが、バランシングポリヌクレオチド配列を含む、請求項5に記載の方法。

7. 前記配列決定ラダーを形成する工程が、標識した鎖のターミネーターを付加する工程を包含する、請求項3に記載の方法。

8. 前記回収可能なプライマーが標識されている、請求項3に記載の方法。

9. 前記配列決定テンプレートが同じポリヌクレオチド上に位置する、請求項3に記載の方法。

10. 前記配列決定テンプレートが異なるポリヌクレオチド上に位置する、請求

項3に記載の方法。

11. 前記回収タグを結合する化合物がポリヌクレオチドである、請求項3に記載の方法。

12. 前記固相支持体が複数プロジェクション電気泳動ローディングデバイスである、請求項3に記載の方法。

13. 前記固相支持体が複数のビーズである、請求項1に記載の方法。

14. 前記固相支持体が複数チャンバー液体保持デバイスである、請求項1に記載の方法。

15. 各配列決定テンプレートがポリヌクレオチド増幅反応によって産生される、請求項3に記載の方法。

16. 前記ポリヌクレオチド増幅反応がPCRである、請求項15に記載の方法。

17. 前記ポリヌクレオチド配列決定ラダーがサイクル配列決定によって形成される、請求項3に記載の方法。

18. 前記ポリヌクレオチド配列決定ラダーが、一連の配列決定によるよりもむしろ配列生成技術によって生成される、請求項3に記載の方法。

19. 前記回収タグを結合する化合物が、配列決定ラダーの生成の間に合成されるポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドである、請求項3に記載の方法。

20. 前記プライマー伸長産物が、増幅プライマー対からのポリヌクレオチド増幅反応産物であり、ここで各プライマー対の少なくとも1つのメンバーが回収タグを有する回収可能なプライマーである、請求項1に記載の方法。

21. 前記方法が、前記固相支持体から前記回収タグを放出する工程をさらに包含し、これによって複数の精製された増幅産物を産生する、請求項20に記載の方法。

22. 前記回収タグがオリゴヌクレオチドである、請求項20に記載の方法。

23. 少なくとも1つの前記回収タグがバランシングポリヌクレオチド配列を含む、請求項20に記載の方法。

24. 前記回収可能なプライマーが標識されている、請求項20に記載の方法。



25. 前記回収可能なプライマーが標識されていない、請求項20に記載の方法。

26. 前記増幅テンプレートが同じポリヌクレオチド上に位置する、請求項20に記載の方法。

27. 前記増幅テンプレートが異なるポリヌクレオチド上に位置する、請求項20に記載の方法。

28. 前記回収タグ結合化合物が、ポリヌクレオチドである、請求項20に記載の方法。

29. 前記固相支持体が複数プロジェクション電気泳動ローディングデバイスである、請求項20に記載の方法。

30. 前記固相支持体が複数のビーズである、請求項20に記載の方法。

31. 前記固相支持体が複数チャンバー液体保持デバイスである、請求項20に記載の方法。

32. 前記固相支持体が、複数のキャピラリーチャンネルを含む、請求項20に記載の方法。

33. 前記回収タグを結合する化合物が、核酸の増幅の間に合成されるポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドである、請求項20に記載の方法。

34. 前記方法が：

前記回収タグ結合化合物に結合した前記増幅産物を放出する工程であって、これによって複数の増幅産物が放出される、工程、

複数の回収可能な配列決定プライマーを該放出された増幅産物と混合する工程、

複数の配列決定ラダーを作成する工程であって、ここで各配列決定ラダーは放出された増幅産物に由来する、工程、

該配列決定ラダーを第2の回収タグ結合化合物に結合させる工程であって、ここで該第2の回収タグ結合化合物は、アドレスを指定できる様式で第2の固相支持体上に固定化される、工程、  
をさらに包含する、請求項20に記載の方法。

35. 複数のポリヌクレオチド配列決定ラダーを作成するためのキットであって、該キットが、

ユニークな回収タグを有する複数の回収可能なプライマーであって、該回収可能なプライマーが統合セットを形成する、を含む、キット。

36. 前記回収可能なプライマーが同じ溶液中に存在する、請求項35に記載のキット。

37. 前記回収タグに特異的な回収タグ結合化合物をさらに含む、請求項36に記載のキット。

38. 前記回収タグ結合化合物が固相支持体の特定の領域に固定化されている、請求項37に記載のキット。

39. 前記キットがDNAポリメラーゼをさらに含む、請求項38に記載のキット。

40. 前記回収可能なプライマーが標識されている、請求項36に記載のキット。

41. 前記キットが標識された鎖ターミネーターをさらに含む、請求項36に記載のキット。

42. 複数の微視的ビーズを含むポリヌクレオチド回収システムであって、ここで各ビーズは、該ビーズ上に固定化された異なる回収タグ結合化合物を含む、システム。

43. 回収タグを含む回収可能なプライマーであって、ここで該回収タグは、核酸増幅反応では複製可能でないオリゴヌクレオチドである、プライマー。

44. 前記回収タグが、核酸増幅反応では複製可能でないポリヌクレオチドアナログである、請求項43に記載の回収可能なプライマー。

45. 前記回収タグが、核酸増幅の間に複製され得ないリンカーによって回収可能なプライマーに連結されている、請求項43に記載の回収可能なプライマー。

46. 前記リンカーが非塩基性ポリヌクレオチドである、請求項45に記載の回収可能なプライマー。

47. 前記リンカーが、ポリエチレングリコールまたはオリゴヌクレオチドアナログである、請求項45に記載の回収可能なプライマー。

48. ポリヌクレオチド配列を増幅するための方法であって、該方法が、  
ポリヌクレオチドの増幅が可能な条件下で、請求項44に記載の少なくとも1つの回収可能なプライマーと増幅テンプレートとを混合する工程、  
を包含する、方法。

49. 複数のポリヌクレオチドを増幅するための方法であって、該方法が、  
ポリヌクレオチドの増幅が可能な条件下で、請求項50に記載の複数の回収可能なプライマーと複数の増幅テンプレートとを混合する工程、  
を包含する、方法。

50. 前記方法が、固相支持体上に固定化されたタグ結合化合物を回収するために前記回収タグを結合する工程をさらに包含し、ここで増幅産物が精製される、  
請求項56に記載の方法。

51. 前記方法が、アドレスを指定できる様式で固相支持体上に固定化されたタグ結合化合物を回収するために前記回収タグを結合させる工程をさらに包含する、  
請求項57に記載の方法。

52. 配列決定反応物または増幅反応物から伸長産物を精製するための、方法。

## 【発明の詳細な説明】

多重性ポリヌクレオチド捕獲方法および組成物発明の分野

本発明は、ポリヌクレオチド配列決定および増幅の分野である。

発明の背景

ポリヌクレオチドの配列決定は分子生物学の確立された技術である。現在、配列決定のために使用されている手順は、本質的に、Sangerら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA74:5463-5467 (1977) またはMaxamら、Methods in Enzymology65:499-559, Academic Press, San Diego, CA (1980) 記述されているものである。ポリヌクレオチド配列決定は分子遺伝学の事実上あらゆる局面に絶対必要になっている。ヒトゲノムプロジェクトおよび種々の生体からのゲノム全体の配列決定は、通常の配列決定テクニックを使用する研究者に対して多大の圧力となっている。加えて、診断目的のために既知の遺伝子の比較配列決定はますます重要となると予想される。

ポリヌクレオチド配列の増幅（代表的には、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)による）はまた、分子生物学の確立されたテクニックである。一部配列決定に対する必要性の増加によりかり立てられた、遺伝子分析の増幅反応数の増加する必要性によって、多数のポリヌクレオチド増幅法を実施する必要性が増加している。

ポリヌクレオチド配列決定の必要性が急激に増加していると仮定すれば、ポリヌクレオチド配列の決定に伴う時間及び費用を節約する圧力がさらに強くなりつつある。配列決定に平行して、すなわち、多重性DNA配列決定を実施するために、数多くの試みがある。PCT出願、PUT/US96/09513および米国特許第5,149,625に記述されている多重性配列決定方法がある。これらのテクニックは実施が困難で、少量の配列情報しか生み出さないか、または、時間または費用の有意な節約を提供しない。同様に、例えば米国特許第5,582,989号に記述されているように、確立されている多重性PCRは大規模に実施することは困難である。

従来配列決定法は、試薬の費用および多数の試料処理段階を必要とするため、高度の情報処理量の配列決定のためには実用的でない。同様に、通常のポリヌ

クレオチド増幅法は、試薬の費用および多数の試料処理段階を必要とするといった数多くの理由による、高度の情報処理量の配列決定のために実用的でない。本明細書中において記述されている発明は、一定期間に獲得される遺伝子情報量を増加するため、および遺伝子情報を得るための費用を減少させるのに使用され得る。

#### 図面の簡単な説明

図1. この図は一对の回収可能なプライマーおよび回収タグ結合化合物の異なる実施態様の例の模式図である。回収タグおよび回収タグ結合化合物は両者のポリヌクレオチド配列である。この配列は、方向を示すために整列されるものであって、3重配列を示すように構築されるべきではない。通常の2重鎖A-TおよびC-Gの対合が示される。星印はテンプレートの特定されていない塩基である。図1Aでは、回収可能なプライマーはバランシング配列 (balancing sequence) を有し、回収タグ結合化合物はバランシング配列とハイブリダイズする。図1Bでは、回収可能なプライマーはバランシング配列を有し、回収タグ結合化合物はバランシング配列および回収可能なプライマーのテンプレートアニーリング領域とハイブリダイズする。図1Cでは、回収可能なプライマーはバランシング配列を有さず、回収タグ結合化合物は回収可能なプライマーのテンプレートアニーリング領域とハイブリダイズする。図1Dでは、回収可能なプライマーはバランシング配列を有さない。新規に合成されたDNAは、太字イタリック文字で示され、そして回収タグ結合化合物は回収可能なプライマーはテンプレートアニーリング領域および新規に合成されたDNA鎖とハイブリダイズする。図1Eでは、回収可能なプライマーはバランシング配列を有さない。新規に合成されたDNAは太字イタリック文字で示され、回収タグ結合は新規合成DNA鎖とハイブリダイズする。

図2. この図は、多重性ポリヌクレオチド増幅に関する本発明の実施態様の模式図である。2Aは二重鎖DNAを示す。2Bは変性DNAを示す。2Cは、変性DNAテンプレートにアニーリングした、2種類の回収可能な増幅プライマーを示す。回収可能なプライマーはテンプレートとアニーリングしない回収タグを有する。2Dはアニーリングした回収可能なプライマーからのプライマー伸長を示す。2EはP

CRの変性の段階を示す。2Fは反復回の増幅のネット成績を示す。2Gは回収タグ結合化合物に結合した、1種類の増幅産物を示す。回収タグ結合化合物は固相支持体（長方形により表示する）。回収タグ結合化合物は個体サポートに付着した短い線により表される。2Hは固相支持体から放出（変性）した後の精製した増幅DNAを示す。

図3. この図は、4倍の多重性ポリヌクレオチド配列決定のための発明の実施態様の模式図である。3Aでは、DNA配列生成反応は同じチューブで同時に生じるが、これによって回収可能な配列ラダーが生成されている。回収可能なプライマーはバランシング配列を有し、回収タグ結合物はバランシング配列とハイブリダイズする。4種類のテンプレートは数字の1～4で示されている。異なる回収可能なプライマーは各々異なる回収タグを有し、文字C,G,YおよびMにより示されている。3Bは同じチューブで起こる4種類の異なる配列決定ラダー生成を示す。

3Cは、ウェルローディングゲルコームの異なるプロジェクション（projection）にアニーングした、分離した配列決定ラダーを示す。回収タグ結合化合物はコームの異なる突起物（プロジェクション）に固定化される。

図4. この図はポリヌクレオチド分離のマイクロチャネル装置の図解である。入力ポート10および出力ポート20が示されている。また、入力ポート付近で固定化されている回収タグ結合化合物30の領域も示されている。チャネル40が示されている。回収タグ結合化合物の模式図は30に連結した直線で示されている。回収可能なポリヌクレオチドは、回収タグ結合化合物付近の曲線によって示されている。

#### 発明の要旨

本発明は、代表的には単一の反応容器内で複数の配列決定ラダー（または他のポリヌクレオチド伸長産物）を同時に産生する方法および組成物、ならびに同時に産生された配列決定ラダーを分析する方法および組成物に関する。各配列決定ラダーは、回収可能なプライマー（すなわち、個々の配列決定ラダーを精製または濃縮するために使用され得る回収タグを含むオリゴヌクレオチドプライマー）

から産生される。あるいは、回収タグの機能的等価物が、回収タグの代わりに使

用され得る。好ましくは、回収タグはオリゴヌクレオチドである。各配列決定ラダーは、回収可能なプライマーに最初に存在していたユニークな回収タグによって特徴付けられる。複数の配列決定ラダーの産生の後、異なるポリヌクレオチド配列決定ラダーは、1以上の固相支持体に固定化された回収タグ結合化合物に結合させることによって、互いに分離される（すなわち、精製される）。回収タグ結合化合物は、回収タグに特異的に結合する化合物である。好ましくは、回収タグ結合化合物は、オリゴヌクレオチド回収タグに相補的であるオリゴヌクレオチドである。回収タグ結合化合物は、アドレスが指定できる様式（例えば、回収タグ結合化合物は、固相支持体に個々の位置を有するか、特定の固相支持体を参考にすることによって位置され得る）で固相支持体に固定化される。回収タグ結合化合物へのポリペプチド配列決定ラダーの結合は、所定の溶液中に存在する異なるポリヌクレオチド配列決定ラダーを分離するために働く。次いで、分離されたポリヌクレオチド配列決定ラダーは、固相支持体から放出され、続いて、配列決定ラダーの個々の成分（すなわち、ポリヌクレオチド）に分解される。本発明の方法は、自動化蛍光ベース配列決定用装置と組み合わせて使用される場合に特に有用である。回収可能なプライマーは、このような装置において使用するために蛍光標識され得る。本発明の配列決定法による配列決定のためのテンプレートは、ポリヌクレオチド増幅産物であり得る。配列決定ラダーは、種々のDNA配列決定技術（サイクル配列決定）によって産生され得る。

本発明の別の局面は、複数の同時に産生されたポリヌクレオチド増幅産物（例えば、複数PCRによって産生される増幅産物）を分離するための方法および組成物を提供することである。本発明の、複数の同時に産生されたポリヌクレオチド増幅産物を分離する方法において、各増幅産物は、ユニークな回収タグ（または、回収タグの機能的等価物）を有する少なくとも1つの回収可能なプライマーから形成される。本発明の他の実施態様において、増幅産物の個々のセットの精製を提供するために、同一の回収タグが、異なる増幅産物において存在し得る。

増幅産物の産生の後、異なる増幅産物は、1以上の固相支持体に固定化された回収タグ結合化合物に結合させることによって、互いに分離される。回収タグ

結合化合物は、アドレスを指定できる様式で固相支持体に固定化される。増幅産物の回収タグ結合化合物への結合は、異なるポリヌクレオチド増幅産物を分離、精製、または濃縮するために役立つ。次いで、分離されたポリヌクレオチド増幅産物は、固相支持体から放出され、続いて分解（例えば、電気泳動によって分離）され得る。本発明はまた、本発明の複数配列決定技術および複数核酸増幅技術を組み合わせる方法を含む。

本発明の別の局面は、回収タグとして、増幅反応の間に複製され得ないオリゴヌクレオチドを有する回収可能なプライマーを提供することである。このような回収可能なプライマーは、本明細書中では「ヒンジプライマー」と呼ばれる。ヒンジプライマーの例は、プライマーと回収タグとのテンプレートアニーリング領域の間の非塩基性領域を含む回収可能なプライマーを含む。ヒンジプライマーの別の例は、回収タグとしてペプチド核酸(PNA)を含む回収可能なプライマーである。ここで、PNAは、プライマーのテンプレートアニーリング領域の5'末端に連結される。ヒンジプライマーの回収タグオリゴヌクレオチドはまた、回収タグオリゴヌクレオチドを非複製可能リンカーの手段によってプライマーに連結することによって増幅反応の間、複製不可能にされ得る。ヒンジプライマーは、複数のポリヌクレオチド増幅反応に特に有用である。なぜなら、回収タグオリゴヌクレオチドを含む二本鎖ポリヌクレオチドを変性（従って、再生を妨げる）する必要がないからである。本発明はまた、複数ポリヌクレオチド増幅反応においてヒンジプライマーを使用する方法を提供する。

本発明の他の局面は、複数のポリヌクレオチド配列決定ラダーまたは増幅産物の産生または回収のためのキットである。このキットは、ユニークな回収タグを有する複数の回収可能なプライマーを含む。回収可能なプライマーは、単一の溶液中に提供され得る。好ましくは、回収タグは、適切な回収タグ結合化合物に結合した場合に実質的に同じ変性温度を有するポリヌクレオチドである（すなわち、プライマーは統合セットを形成する）。キットは、回収タグ結合化合物をさらに含む。回収タグ結合化合物は、好ましくは、空間的にアドレスを指定できる様式で固相支持体に固定化されて提供される。キットは、標識鎖ターミネーター、DNAポリメラーゼ、ピロホスフェート、非標識鎖ターミネーター、DNAポリメラー



ぜ、

ピロホスファターゼまたはPCRもしくは配列決定反応に必要とされる他の成分をさらに含み得る。

本発明の他の局面は、本発明の方法における使用に最適化された配列決定用プライマーまたは増幅プライマーのセットを含む。プライマーのこのようなセットの例は、類似した変性条件下で回収タグ結合化合物から放出され得る回収可能な配列決定プライマーのセットである。このようなセットに含まれるプライマーは、ヒンジであってもよいしなくてもよい。

本発明の他の局面は、ポリヌクレオチド回収デバイスを含む。このようなデバイスは、本発明の方法において使用され得る。ポリヌクレオチド回収デバイスは、いくつかの実施態様では、空間的にアドレスを指定できる様式で1以上の固相支持体に固定化された複数の回収タグ結合化合物を含む。好ましくは、回収タグ結合組成物は、ポリヌクレオチドである。本発明のデバイスの1つの実施態様において、固相支持体はキャピラリーチャンネルのアレイである。本発明の他の実施態様において、固相支持体はまた、ビーズまたは複数プロジェクション電気泳動ローディングデバイス（例えば、ゲルコーム）、もしくはサンプルを取り扱うための他の複数プロジェクションデバイスの形態をとり得る。

#### 特定の実施態様の記載

#### 定義

「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、天然に存在するポリヌクレオチド、例えばDNAまたはRNAを含むように幅広く使用されており、天然に存在するポリヌクレオチドのアナログも含んでいる。このようなアナログはホスホルアミデート、ペプチド-核酸、リン酸チオエート（phosphothioates）、メチルホスホン酸塩などを含むが、これらに限定されない。天然に存在しないバックボーンに加えて、天然に存在するポリヌクレオチドのアナログは核酸塩基アナログ（例えば、7-デアザグアノシン、5メチルシトシン、イノシンなど）を含み得る。ポリヌクレオチドの合成法の説明は、以下の米国特許の諸個所にみいだし得る：第4,373,071号；第4,401,796号；第4,415,732号；第4,458,0

66号；第4,500,707号；第4,668,777号；第4,973,679号；第5,047,524号；第5,13

2,418号；第5,153,319号および第5,262,530号。

本明細書中で使用されている「配列決定ラダー」という用語は、鎖終結配列決定反応（例えば、ジデオキシ配列決定）か、または化学的切断配列決定（例えばMaxamおよびGilbert配列決定）のいずれかの配列決定反応より生成されるポリヌクレオチドのセットを言う。配列決定ラダーの生成プロセスは「配列決定ラダー生成」または「配列ラダーの生成」と本明細書中で呼ばれる。ポリヌクレオチド配列決定ラダーの生成法は、当業者に周知である。配列決定ラダーの生成法の例は、とりわけ、Sambrookら、Molecular Cloning Methods: A Laboratory Manual Coldspring Harbor, Coldspring, Harbor Press (1989) 中に見出し得る。特定配列決定ラダーの異なるポリヌクレオチド、例えば、メンバーは互いに長さが異なるが、同じラダーのすべてのメンバーは配列決定ラダーが由来する同じオリゴヌクレオチドプライマーを含む。このように、同じテンプレートプライミング部位にアニーリングするが、回収タグの同一性に関して異なる、第1と第2の回収可能なプライマーからの配列決定ラダーの生成は2種類の異なる配列決定ラダーを生じると言われる。同じプライマーに由来することに加えて、一定のポリヌクレオチド配列決定ラダーのメンバーはまた、同じ配列決定テンプレート由来である。標識プライマー配列決定において、単一の完全な配列のみが4種類の構成的配列決定ラダーの情報を組み合わせて得られるが、4種類の異なるラダー（異なるジデオキシ終結塩基を使用する）各々は、別々に生成される。（および、続いて分析前に組み合わせられ得る）。同じ回収可能な配列決定プライマーおよびテンプレートが別々の反応容器で配列決定ラダーを生成するのに使用される場合、生成される配列決定は異なる配列決定ラダーであるといわれる。

「特異的な結合対」という用語は、互いに特異的に結合する1対の分子に適用される。特異的な結合対の実例は抗体-抗原（またはハプテン）対、リガンド-受容体対、ビオチン-アビジン対、相補性塩基対を有するポリヌクレオチドなどを含むが、これらに限定されない。各特異的な結合対は2種類のメンバーを含むが、一定の特異的な結合対のメンバーのいずれかに特異的に結合し得る付加化合

物が見出され得る可能性がある。

本明細書中に使用されている「回収タグ」という用語は、特異的な結合対の分子メンバーである化合物（または化合物の一部）をいう。回収タグはいずれかのクラスの巨大分子（例えば、ポリヌクレオチド、炭水化物(糖質)、ポリペプチドなどに属し得る。好ましくは、回収タグはオリゴヌクレオチドである。回収タグは、また天然に存在しない分子クラスに属し得る。回収タグがオリゴヌクレオチドである場合、回収タグは回収可能のプライマーのテンプレートアニーリング配列を包括しない、一部またはすべてを含み得る。

回収タグがオリゴヌクレオチドである場合、回収タグは、必要に応じてバランシングポリヌクレオチド配列を含み得る。「バランシングポリヌクレオチド」という用語は、回収タグ結合化合物にハイブリダイズするポリヌクレオチドをいうが、配列決定(または増幅)テンプレートに特異的にハイブリダイズしない。バランシングポリヌクレオチドは、必要に応じて回収可能なプライマー上に存在する。バランシングポリヌクレオチドは、同じ反応容器で一緒に使用される、異なる回収タグおよび回収タグ結合化合物対の間で形成された二重鎖(または三重鎖)の融点を均等にする、すなわち、バランスをとるのに使用し得る。同様に、バランシングポリヌクレオチドは、同様の条件下で変性されるべき異なる回収タグおよび回収タグ結合化合物対の間で形成される二重鎖(または三重鎖)の融点を均等にする、すなわち、バランスをとるのに使用され得る。

本明細書中において使用している「回収タグ結合化合物」という用語は、一定の回収可能なプライマー上の回収タグではない特異的な結合対のメンバーをいう。回収タグとしてポリヌクレオチドを用いる発明の実施態様では、回収タグ結合化合物は、目的の回収タグポリヌクレオチドに相補的または部分的に相補的であるポリヌクレオチドを含む。個々の回収タグ結合化合物分子は相補的(または部分的に相補的)ポリヌクレオチド配列の複数のコピーを含み得る。枝分かれポリヌクレオチド (branched polynucleotide) (例えば、公開されたPCT特許出願W0 96/016104および公開された欧州特許出願EP646595に記述されている) は、回収タグの結合部位の有効濃度を増加させるのに使用され得る。

“回収可能なプライマー”という用語は、回収タグを含むオリゴヌクレオチドに適用される。回収可能なプライマーはポリヌクレオチド配列決定反応またはポリヌクレオチド増幅反応を特異的にプライミングするのに使用し得る。

すなわち、回収可能なプライマーは配列決定テンプレート(または増幅)上の特定(通常、予め決められた)に特異的に結合し得るポリヌクレオチド配列を含む。テンプレートに部位特異的にハイブリダイズし得る回収可能なプライマー部分は、本明細書中で、回収可能なプライマーの“テンプレートアニーリング配列”として適用されている。テンプレートアニーリング配列は、関心テンプレート上の部位または部位(複数)に特異的にハイブリダイズするのに十分な長さであり、典型的な長さは18~36個のヌクレオチドである。ポリヌクレオチド配列決定に使用するテンプレートアニーリング配列は、目的のテンプレート上のユニークな部位とハイブリダイズしなければならない。プライミング部位に部位特異的にハイブリダイズする回収可能なプライマーの能力を回収タグが干渉するのを回避するように、回収タグはプライマーと結合している(例えば、回収タグは、回収可能なプライマーの5'末端、または近位で連結され得る)。回収タグをオリゴヌクレオチドプライマーに連結する特定の手段は、回収可能なタグが属する化合物のクラスに依存する。回収タグがポリヌクレオチドである場合、回収タグは、好ましくは、ポリヌクレオチド連鎖によって結合される。回収タグがタンパク質である場合、回収タグは、好ましくは、DDS(ジサクシニイミジルスベリン酸(suberate))、SPDP(N-サクシニイミジル3-(2-ピリジルジチオプロピオン酸))、SATA(N-サクシニイミジルS-アセチルチオ酢酸塩)などといった二機能性架橋化剤によって連結される。ポリヌクレオチドへの接触ラベル方法の詳細なプロトコールは、とりわけ、G.H.Hermanson Bioconjugate Technique, Academic Press, San Diego, (1996)の中に見出し得る。

回収可能なプライマー上の回収タグがポリヌクレオチドである場合、回収タグは回収可能なプライマーのテンプレートアニーリング配列のすべてか、部分を含み得るし、または含まなくてもよい。発明のいくつかの実施態様では、回収タグは回収可能なプライマーのいくつかの配列またはすべてから構成され得る。本発

明の他の実施態様では、回収タグは回収可能なプライマーのテンプレートアニーリング配列のいずれの部分をも含まない。発明のさらなる他の実施態様では、回収タグはbalancingポリペプチドを包括する。回収タグ全体はbalancingポリヌクレオチドであり得る。あるいは、回収タグはbalancingポリヌクレオチドおよびこれに隣接するテンプレートアニーリング部分から構成され得る。

ポリヌクレオチド配列決定またはポリヌクレオチド増幅の実施態様のいずれかで使用する回収タグは、ハイブリダイズ状態の一定のセット下で、標的ポリヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズし得る。配列特異的なプライマーの設計の基準は、普通の当業者にとっては周知のことである。部位特異的なアニーリングに付与しようとするプライマー設計基準の詳細な記述は、DieffenbachおよびDveksler, PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Press (1995) およびKwokら、Nuc.Ac.Res.18:999-1005(1995)の他の箇所の中にみだし得る。プライマーのテンプレートアニーリング配列部分は、目的のテンプレート部位に部位特異的にアニーリングさせるのに十分な長さである。配列決定のプライマーは単一のテンプレート部位にユニークにハブリッド形成するように設計されている。回収可能なプライマーのテンプレートアニーリング配列は完全にか、または部分的に標的配列の塩基（すなわち、アニーリング部位）に相補性であり得る。好ましくは、回収可能なプライマーのテンプレートアニーリング配列は対応する標的配列の塩基に対して完全に相補的である。

回収可能なプライマーから生成する配列決定ラダーは、「回収可能な配列決定ラダー」と呼ばれ得る。さらに、「回収可能な配列決定ラダー」という用語は、非回収タグ多重性方法時に生成される配列決定ラダーといった回収タグの機能的な等価物を包括する配列決定ラダーを含む。回収可能なプライマーより生成されたポリヌクレオチド増幅産物は“回収可能な増幅産物”として適用され得る。加えて、「回収可能な増幅産物」という用語は、回収タグの機能的な等価物（例えば、非回収タグ多重性方法の間に生成される配列決定ラダー）を含む配列決定ラダーを含む。

本明細書中で使用されている「ポリヌクレオチド増幅反応」という用語は、特定のポリヌクレオチド配列の増幅の広範囲のテクニックに適用される。このような増幅テクニックの例には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応、LCR（Guatelliら、Proc.Natl.Aca.Sci.USA 87:1874-1878(1990)、核酸配列に基づく増幅法（NASB）（van Gemenら、J.Virol.Methods 45:177-188(1993)）がある。PCRは本発明の目的のための、好ましいポリヌクレオチド増幅反応である。

### 本発明

本発明は、代表的には、単一の反応容器で複数のポリヌクレオチド配列決定ラダーを同時に生成するための方法および組成物、ならびに同時に生成した配列決定ラダー由来の配列情報を分析するための方法および組成に関する。各配列決定ラダーはユニークな回収タグを構成する回収可能なプライマーより形成される。配列決定ラダーを構築するポリヌクレオチドセットの全てのポリヌクレオチドメンバーは、本質的に同じ回収タグ（または回収タグの機能的な等価物）で標識されている。多重性配列決定ラダーの同時生成後に、異なるポリヌクレオチド配列決定ラダーは、固相支持体上に固定化されている回収タグ結合化合物に回収タグ（または回収タグの機能的な等価物）を結合することにより互いに分離される。回収タグ結合化合物はアドレスを指定できる様式で固相支持体上に固定化されている。すなわち、回収タグ結合化合物は固相支持体上に個々の位置を有する。回収タグ結合化合物へのポリペプチド配列決定ラダーの結合は、異なるポリヌクレオチド配列決定ラダーを分離するのに役立つ。分離されたポリヌクレオチド配列決定ラダーは、次いで固相支持体から放出され、続いて配列決定ラダーの個々のポリヌクレオチド成分に分解され得る。配列決定ラダーを分離するための本発明の方法は、同時に生成される複数のポリヌクレオチド増幅産物を分離または捕獲するのに容易に適応され得る。本発明の方法は、蛍光ポリヌクレオチド分析装置、例えば自動シーケンサーとともに使用する場合に特に有用である。

本発明の方法により提供される操作数の節減の有意性は、高度の情報処理量の配列生成または高度の情報処理量の核酸増幅が必要である場合に、特に重要とな

る。96例より採取した各血液試料から108の配列を分析している、以下のような実施例を考慮すること。通常の方法には以下のような段階がある：96のテンプレート調製、10,368のPCR反応（108X96）、10,368のDNA精製、精製DNAの配列決定反応物への31,104回（ $3 \times 10,368$ ）の転移（各PCR増幅から生成される、3種類の配列の平均を仮定する）、配列決定反応物の31,104回の精製および配列決定ゲルレーンの31,104回のローディング）。同量の配列情報は以下のような発明の方法によって獲得し得る。96回のDNA調製、864回のPCR反応（各試料に対して9回の12

重反応）、27の96ウェルプレートにPCR増幅産物を移し、精製するための27回のハイブリダイズ反応（一度に96サンプル）、4アンプリコン/ウェル、2,592回の12重配列決定反応、配列決定反応産物（一度に96回）の312の選択および分離装置への充填（一度に96回）。このように、本発明の方法の多重性化配列決定およびポリヌクレオチド増幅を使用することにより、操作数は30倍以上減少し得る。

本発明の方法および組成物は、ポリヌクレオチド配列決定のより初期の方法と比較して有利である多数の局面を有する。発明に重要で、有利である局面は、増大した量の配列情報が、同一または類似の量の試薬から得られ得て、それにより、一定ユニットの配列情報を生み出すのに伴う費用を有意に低減させることである。他の重要な発明の局面は、複数の配列ラダーは同じ反応容器で複数の配列決定ラダーを同時に形成し得ることである。同じ反応容器で、複数の配列決定を同時に生成することにより、試料処理操作数は減少する。試料操作数の減少は、配列ラダーを生成し得て、試料処理エラーの機会を減らすことになる。通常の方法、例えばChurchら（米国特許第5,149,625号）によって優れている本発明の他の局面には、プロットング段階の必要性がないことおよび特殊なベクターへの配列決定のポリヌクレオチドをサブクローニングする必要性がないことが含まれる。本発明のほかの有利な点は、配列決定ラダー、アンプリコン（ポリヌクレオチド増幅産物）、または他のプライマー伸長産物を最少量の操作で精製、分離または濃縮し得ることである。

本発明の方法で実現した試薬消費の減少の程度は、大部分、多重性化の程度によって決定されている。例えば、2倍、多重性化している配列決定反応は、すな

わち、2種類の配列決定ラダーは単一の反応容器で同時に生成される、いくつかの配列決定試薬の必要性を2倍まで必要性を減らし得る。同様に、8倍多重性化している配列決定反応は、すなわち8種類の配列決定ラダーは単一の反応容器で同時に生成する、いくつかの試薬の必要性を8倍まで減らし得る。このように、発明は単一の配列ラダー生成反応で、“過剰”ポリヌクレオチド合成の可能性を活用する。付加的な大量の配列情報(2倍またはこれ以上)は、通常の配列決定手順で単一の配列決定ラダーを生み出すのに使用する、同量のDNAポリメラーゼおよび他の試薬を使用することにより獲得し得ることは予期しない結果であった。

適切な長さの範囲で配列決定ラダーを生成するために、相対的に高いレベルの酵素、dNTPs、鎖終結因子(ラベルまたは非ラベル)などを必要としている。配列決定ラダーからの有用な情報が失われるために、単一のポリヌクレオチドラダーを生成するのに使用する試薬量を簡単に減らすのことを、本発明の方法で実現したほど、劇的に試薬費用を減らすのに使用し得ない。例えば、あまりにも大量のポリメラーゼ濃度を減らすことはシグナル強度を減らすことになり、これにより、読み取り長を減らすことになる。試薬濃度をDNAポリメラーゼの $K_m$ 近くまたは以下に落とす場合、簡単に試薬濃度を減らすことによって別の問題が起こる。

前述の考察は、主に配列決定およびポリヌクレオチドの増幅の多様な方法に関するが、本発明の一般的な原理は、本質的にプライマーの伸長を含む任意の分子生物学的技術に容易に適用し得ることが、当業者によって理解される。各々がユニークな回収タグ(またはそれらの機能的な等価物)を有する、複数の回収可能なプライマーを使用することにより、複数のプライマー伸長反応を同時に実施し、続いて反応産物を固定化した回収結合タグ化合物への結合に基づき分離し得る。使用されるプライマー伸長反応のこれらの多くの多重性化された方法は、本発明の実施態様と考えられる。鎖終結配列決定(Sanger法)およびPCRはプライマー拡張反応の実例である。本発明の方法はまた、米国特許第4,883,750号;同第4,998,617号および同第5,242,794号に記載されるタイプのような多重性化オリゴヌクレオチド連結アッセイを提供するために使用し得る。

本発明は、配列決定反応もしくは増幅反応、または他のタイプのプライマー伸



長反応が種々の程度に多重性化することが可能となる。この配列決定反応は、2つ以上の因子によって多重性化され得る。代表的なものとして、多重性化は2と20種類との間の因子によってである。しかし、本発明はまた多重性化が20種類以上の因子によってである実施態様を含む。

本発明の多重性配列決定は同じ溶媒中での複数のポリヌクレオチド配列決定ラダーの同時生成を含む。この方法は、複数の回収可能な配列決定プライマーと1種類以上の鋳型との混合段階を含む。混合は、単一の反応容器中で行われ得る。混合する行動は、同じ溶液へ回収可能なプライマーおよび鋳型を静置し、これによりプライマーを伸長し得るように、鋳型（または複数の鋳型）上に特定部位で

プライマーをアニーリングするのを可能にする。必要に応じて、溶液成分を含む混合を改善するために、反応容器を振盪し得る。反応容器は、プライマー、鋳型、酵素、dNTP、鎖ターミネーター、および配列ラダー生成に必要な他の試薬のための容器として役立つ。反応容器は、当業者に公知の種々の形状およびサイズのいずれかを採用し得、このような形状はEppendorfチューブ、密封毛細管、被覆マルチウエルプレートなどを含むが、これらに限定されない。混合段階後または同時に回収可能な配列決定プライマーは、それらの各々の鋳型にハイブリダイズ（アニール）するのを可能にする条件に供される。本発明の方法に使用される複数の鋳型は、同じか、または異なるポリヌクレオチド分子上に存在し得る。例えば、単一の染色体またはプラスミドは、同じDNA分子の複数領域にアニーリングするように、回収可能なプライマーが選択される場合、複数の配列決定鋳型を含み得る。あるいは、個々の回収可能なプライマーは、個々のDNA分子として存在する複数の鋳型にハイブリダイズするように設計され得る。配列決定のために設計された回収可能なプライマーは、同じ配列生成反応の間、同じポリヌクレオチド配列の両者の鎖をプライムするのに使用され得る。配列決定鋳型の例は、DNA、cDNA、RNA、またはクローニングベクターに挿入された染色体DNAなどを含む。必要に応じて、配列決定鋳型はPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）のような、ヌクレオチド増幅反応により生成されたポリヌクレオチドであり得る。

回収可能なプライマーが同じ鋳型の同一鎖にアニーリングする発明の実施態様

では、鋳型上のアニーリング部位は、配列決定ラダー生成の間、2つの部位の間の相互作用を検出し得るように、互いに十分に接近し得る。例えば、第1配列決定プライマーおよび第2配列決定プライマーは、第2プライマーのアニーリング部位に関して、第一プライマーが約400塩基の5'でアニーリングするように、同じ染色体にアニーリングするように、選択され得る。配列ラダーシグナルの強度、すなわち第1プライマーから生成された、配列決定ラダーのポリヌクレオチド構築物の量は、配列ラダーが第2プライマーのアニーリング部位より伸長する場合、(検出できないレベルではないが)突然に減少する。この強度の減少は、2つのプライマーより得られた配列情報が連続している時点を決断するのに使用し得る。

複数のポリヌクレオチド配列決定ラダーの同時生成の本発明の方法は配列決定

ラダー形成の段階を包含する。形成された配列決定ラダーの各々は混合段階で添加した回収可能なプライマー由来である。配列決定ラダー用のプロトコールは、当業者には周知である。鎖ターミネーター配列決定は本発明の方法を使用するための好ましい配列決定ラダー生成法である。本発明の最も好ましい実施態様では、配列決定ラダーはサイクル(周期)配列決定により形成される。サイクル配列決定の記述は、Murray V. , Nucl. Acid Res. , 17:8889 (1989)のなかに見出され得る。代表的なサイクル配列決定は以下のような段階を包含する配列決定ラダー生成技術である。: (a) プライムされた鋳型を形成するための、プライマーオリゴヌクレオチドと配列決定の鋳型とのハイブリダイゼーション、(b) DNAポリメラーゼによるプライマーの伸長、(c) 鎖ターミネーター(例えば、ジデオキシヌクレオチドターミネーター)による伸長反応の終了、(d) プライムされた鋳型の変性、(e) 複数サイクルの工程(a)から(d)の反復。サイクル数の増加は生成された標識化ポリヌクレオチドの生成量を増やし、これにより比較的少量の出発物質を補うのに使用され得る。

鎖ターミネーター配列決定の数多くの異なる方法は、所定の鋳型より配列情報を獲得するのに使用され得る。異なる方法は、標識化の部位(プライマー上または鎖ターミネーター上の)のようなパタメータの変動を含み得る; 使用した標識

の同一性、使用した標識の数など。

本発明の1つの実施態様（例えば標識化ターミネーター配列決定）は、配列情報は、各々が異なるヌクレオチド塩基に対応し、特有の蛍光標識で標識化されている4種類の鎖ターミネーターを使用して、所定の鋳型および単一の回収可能なプライマーより得られ得る。本発明の別の実施態様では、酵素標識、放射活性標識のような非蛍光標識は、配列決定プライマーまたは鎖ターミネーターを標識するのに使用され得る。

本発明の別の実施態様（例えば、標識化プライマー配列決定）では、回収可能なプライマーが標識化され、各々が同じ鋳型部位にアニールするが、特有の蛍光標識を有する4種類の特異な回収可能なプライマーが、多重性化配列決定反応で各鋳型の配列を得るため、4個の別々の反応容器で使用される。例えば、4種類の標識化された回収可能なプライマーの第1セットは、所定の鋳型上の同一部位で

プライムするために調製されている。セットのこれらプライマーの各々は、異なる検出可能な標識でタグ化されている（4種類のスペクトル的に特有の標識を使用する）。セットのこれらプライマーの各々の上の回収タグは同じか、または異なる回収タグで標識化されている（好ましくは、同じ回収タグをセットの各ナンバーに使用する）。さらなる4種類のプライマーセットが配列決定すべき各鋳型用に調製される。次いで、各容器が複数のプライマー（および鋳型）を含むが、各プライマーセットから1つのプライマーのみであるように、各セットのプライマーの異なる数が4種類の反応容器間で分配される。次いで、各容器で単一タイプの鎖ターミネータージデオキシヌクレオチド（A、G、C、またはT）を使用して、鎖ターミネーター配列ラダー生成反応が各容器で調製される。配列決定反応が完了した後、固相支持体、例えば、所定のセットのプライマーのすべての回収可能なプライマー上にある回収タグに、特異的な固定化回収タグ結合化合物を有する巨視的ビーズ（または複数のビーズ）は、各容器の溶液間で逐次移される；あるいは、巨視的ビーズに接触する前に、異なる容器の反応容器内容物を一緒に混合し得る。反応容器内容物を接触するプロセスは、各配列決定ラダーセットを分離するために提供するように、異なる固定化回収タグ結合化合物を使用して反復

される。

ABI 377またはABI 310 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CAから入手可能) のような蛍光的に標識化したポリヌクレオチドの分離および検出用の自動化機器で、分離および分析の対象となる配列決定ラダーを生成するために、生じたポリヌクレオチド配列決定ラダーは蛍光的に標識化され得る。自動化配列決定装置の記載は、米国特許第4,232,769号、同第4,603,114号；同第4,704,256号；同第4,811,218号；同第5,277,780号；同第5,290,419号；同第5,307,148号；同第5,336,608号；同第5,384,024号；および同第5,543,026号の別の個所の中に見出し得る。蛍光標識は回収可能なプライマーまたは鎖ターミネーターに付着し得る。適切な蛍光標識には、6-カルボキシフルオレセイン(6-FAM)、5-カルボキシフルオレセイン(5-FAM)、6-カルボキシ-4,7,2',7'-テトラクロロフルオレセイン(TET)、6-カルボキシ-4,7,2',4',5',7'-ヘキサクロロフルオレセイン(HEX)、5-(および6)カルボキシ-4',5',-ジクロロ-2',7'-ジメチトキシフルオ

レセイン(JOE)、および5-カルボキシ-2',4',5',7'-テトラクロロフルオレセイン(ZOE)、テトラメチルローダミン(TAMRA)、4,7-ジクロロテトラメチルローダミン(DTAMRA)、ローダミンX(ROX)、ローダミン6G(R6G)、ローダミン100(R110)などが含まれるが、これらに限定されない。適切な蛍光標識の記載は、米国特許第5,366,860号(Bergot)、米国特許第5,188,934号(Menchen)、米国特許出願08/626,085(1996年4月日登録)、Leeら、20(10):2471-2483(1992)の別の個所のなかに見出し得る。PCT特許公開W095/21266のMathiesに記述されているように、望ましいスペクトル特性を得るために提供するように蛍光標識間での共鳴エネルギー転移のために互いに関連して複数の蛍光標識を使用し得る。色素として使用するのにとくに好ましいのは、1996年5月3日登録の米国特許出願第08/642,330号、および1996年10月4日登録の同08/726,462号、に記載されている色素分子である。

ポリヌクレオチドの鎖終結配列決定の夥しいプロトコールが公表されており、分子生物学の当業者には周知である。熱安定性酵素、蛍光標識化プライマー、および蛍光標識化ターミネーターといった高価な試薬に関して、有意な節減を現実

化するために、複数のポリヌクレオチド配列決定ラダーを同時に生成(および、生成したラダーを分離)するために、本発明の方法とともに、これらの公表された技術を使用し得る。従来のポリヌクレオチド配列決定技術は、通常生成する各配列ラダーのために、少なくとも8から12ユニットのTaqDNAポリメラーゼを使用する。AmpliTaqDNAポリメラーゼ(Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA)という名称で販売されている、熱安定ポリメラーゼに関して、本明細書中に使用している“ユニット”という用語は、74℃、30分間で、10mmolのdNTPを酸不溶性ポリヌクレオチド材料に組み込んだ酵素量と定義されている。この定義は、他の熱安定DNAポリメラーゼの対応量を測定するのに使用され得る。前述の“ユニット”の定義は、多くのDNAポリメラーゼに適用され得るが、AmpliTaqDNAポリメラーゼに限定されない。このように、発明の方法を使用することにより、配列決定ラダーは、生成した各配列決定ラダーに対して、DNAポリメラーゼの約4か6ユニット(2倍の多重性化)か、またはこれ未満を用いることによって、配列決定ラダーを生成し得る。熱安定および熱不安定の両方である種々の異なるDNAポリメラーゼは、配列ラダー生成に使用し得て、そして同程度の試薬使

用の節減は異なるDNAポリメラーゼで達成し得ることも、また当業者によって理解できるであろう。夥しい、異なるDNAポリメラーゼまたはDNAポリメラーゼの混合物で達成し得ることも、また当業者によって理解される。サイクル配列決定を通して配列ラダーを生成すると、使用されるDNAポリメラーゼは、好ましくは熱安定性DNAポリメラーゼである。適切な熱安定DNAポリメラーゼの例として、Taq<sup>®</sup> (Perkin-Elmer, Norwalk CT), Vent<sup>™</sup> (New England Biolabs, Beverly MA), Deep Vent<sup>™</sup> (New England Biolabs, Beverly MA), Pyrococcus furiosus DNAポリメラーゼ(Stratagene, La Jolla CA)、Thermotoga maritima DNAポリメラーゼ、およびAmpliTaqDNAポリメラーゼ、FS<sup>™</sup> ポリメラーゼおよびAmpli DNAポリメラーゼ、Taq FS DNAポリメラーゼが含まれる。Taq FS DNAポリメラーゼ(Perkin-Elmer, Norwalk CT)はサイクル配列決定での使用について、特に好ましい。

十分量のポリヌクレオチドが形成された後、すなわち選択された分析機器に容

易に検出できる量であると、配列決定ラダー上の回収タグ（または増幅産物）により、空間的にアドレスを指定できる様式で固相支持体上に固定化されている回収タグ結合物に結合できるようになる。便宜上、この段階は「引き出す」または「引き出すこと」として引用し得る。回収タグをそれらの同族の固定化回収タグ結合物に結合することにより、配列決定ラダー（または増幅産物）は互いに分離して、固相支持体上の固定化より精製される。回収タグとそれらの同族の回収タグ結合物との間の結合は、配列ラダー生成（または核酸増幅）が生じている溶液（単数または複数）に固定化回収タグ結合物に接触することにより達成し得る。回収タグとそれらの同族の回収タグ結合物との間の結合は、本発明の目的に効果的にするために標識化ポリヌクレオチドの100%結合（または、実質的な部分でさえ）を必要としない。ポリヌクレオチド結合量は、次の段階で放出されるポリヌクレオチド上の標識から検出可能なシグナルを産生するために十分であるだけが必要である。回収タグ結合物と配列決定ラダー上の回収タグとの間の接触は、配列決定ラダー形成が完了した後か、または配列決定ラダー生成（または増幅産物の生成）と同時かのいずれかで開始し得る。好ましくは、配列決定ラダー生成（または核酸増幅）が完了した後に接触が開始される。回収可能な配列決定ラダーポリヌクレオチド（または核酸増幅産物）を含む溶液は、

（例えば、pH、イオン強度、または溶液の塩類濃度を変えるように）回収タグと回収タグ結合物との間の結合を増強するために、試薬の添加により修飾し得る。回収タグと回収タグ結合物との間の結合もまた、DNA結合タンパク質または他のDNA結合物の添加により改変し得る。固定化回収タグ結合物と回収タグとの間の接触は、検出可能な量のポリヌクレオチドを固定化回収タグ結合物に結合させるのに十分な期間であるべきである。回収タグを十分に結合させるのに必要な時間の量は、所定の実施態様で使用するために選択された特定の回収タグおよび回収タグ結合物に従って変化する。回収タグを十分に結合させるのに必要な時間の量はまた、特定の回収タグおよび回収タグ結合物の有効濃度に従って変化する。同様に、回収タグを結合させるのに必要な条件は、

所定の実施態様で使用するために選択された特定の回収タグおよび回収タグ結合化合物に従って変化する。回収タグおよび回収タグ結合化合物の両方が、ポリヌクレオチドである場合、十分に確立された経験に由来する処方および核酸二本鎖（または三重鎖）形成に関する他の情報は、回収タグと回収タグ結合化合物との間の結合の条件および時間を至適化するために使用され得る。核酸ハイブリット形成および変性の反応速度論はよく理解されており、結合および放出に必要な時間および条件を算出するのに使用され得る。核酸ハイブリットの動力学に関する情報は、とりわけBergerおよびKimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Academic Press, San Diego(1987), CantorおよびSchimmel, Biophysical Chemistry, Part III: The Behavior of Biophysical Macromolecules, W.H. Freeman, NY, (1980), Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag, New York(1989)などに見出され得る。

回収タグをそれらの同族の回収タグ結合化合物に結合する工程は、連続的また同時であり得る。連続的結合では、例えば、複数の回収タグを含む混合物は第1固定化回収タグ結合化合物と接触され、続いて第2固定化回収タグ結合化合物と接触される。混合物を含む回収タグは、さらなる固定化回収タグ結合化合物と反復的に接触され得る。同時結合では、複数の回収タグを含む混合物は、1種類以上の異なる固定化回収タグ結合化合物を含む固定化回収タグ結合化合物の1組と接触される。連続的かつ同時結合手順は、1種類以上の回収タグ結合化合物を含む

固定化回収タグ結合化合物のセットと連続的に結合することにより、組み合わせられ得る。

放出工程は、固定化回収タグ結合化合物に結合しているポリヌクレオチド配列決定ラダー（すなわち増幅産生物）を分析を提供するために実施される。放出工程は、それらのコグネイト回収タグ結合化合物への特異的結合手段によって、固相支持体に結合しているポリヌクレオチド配列決定ラダー（または増幅産生物）を放出するのに役立つ。代表的には、配列決定ラダー（または増幅産生物）は、回収タグから回収タグ結合化合物を解離することより放出される。しかし、放出もまた、回収タグ結合化合物と固相支持体との間との連結（共有結合か、また

は非共有結合のいずれか)を切断することにより達成され得る。重要なことに、回収タグが固定化回収タグ結合化合物に結合する間に導入された異なる配列決定ラダーの分離を維持するような様式で放出工程が実施される。放出工程が、配列決定ラダーの分離を維持するのを可能にするために、分離され放出された配列決定ポリヌクレオチド(または増幅産生物)は、放出プロセスと同時に個々に採集される。放出されたポリヌクレオチド 配列決定ラダー(または増幅産生物)の採集は、放出されたポリヌクレオチドを採集するのに使用される、複数の異なる技術およびデバイスの配置によって達成され得る。適切な採集技術の範囲は、回収タグ結合化合物の固定化に使用される固相支持体の特定の配置に部分的に依存する。好ましくは、放出されたポリヌクレオチド 配列決定ラダー(または増幅産生物)の採集は、放出されたポリヌクレオチド 配列決定ラダーをポリヌクレオチド分離デバイス(例えば、電気泳動ゲル)に、充填することで直接的に組み込まれている。例えば、回収可能な配列決定ラダーの放出は、配列決定スラブゲルまたは毛細管の充填領域に起こり得て、ここで異なる配列決定ラダーは各々別々の充填領域に沈着する。本発明の他の実施態様では、放出された配列決定ラダーは、チューブまたはマイクロタイターディッシュウェルのような個々の採集容器に別々に採集され、そしてポリヌクレオチド分離デバイス上に充填する前に、一時的に貯蔵される。例えば、その表面上に固定化された回収タグ結合化合物を有する巨視的ビーズを、回収可能な配列決定ラダーに結合した後に、Eppendorfチューブに移し、それによりEppendorfチューブ中での配列決定ラダーの放出を提供し得る。

次いで、放出された配列決定ラダーは、分析のために電気泳動分離デバイスに移され得る。

固相支持体から回収タグを放出するために選択される特定の手段は、本発明の所定の実施態様のために選択された、特定の回収タグおよび回収タグ結合化合物に従って変化する。放出工程は、有効であるために、結合した配列決定ラダー(または増幅産生物)の100%の放出を必要としない。放出されたポリヌクレオチドの量は、放出されたポリヌクレオチド上の標識よりの検出可能なシグナルを生



みだすために十分であることを必要とする。特定の実施態様で使用される特定の回収タグおよび回収タグ結合化合物に適合した種々の手段のいずれかによって、放出は達成され得る。異なる回収タグは、本発明の所定の実施態様において同じかまたは異なる放出手順により放出され得る。好ましくは、本発明の所定の実施態様においてすべての回収タグは同じ手順によって放出される。回収タグおよび回収タグ結合化合物が、両方ともポリヌクレオチドである場合、放出は、好ましくは、回収タグとそれらの対応する回収タグ結合化合物との間で形成された二重鎖（またはおそらくは三重鎖）の変性により達成される。多鎖ポリヌクレオチドの変性温度を制御する因子（例えば、陽イオン濃度）は、分子生物学の当業者には周知である。したがって、ポリヌクレオチド回収タグの放出は、結合したポリヌクレオチドを上昇した温度にさらすか、または適切な濃度の尿素またはホルムアミドのような変性剤を添加することによって達成され得るさらに、ポリヌクレオチド回収タグは、酵素的手段により放出され得る。例えば、二本鎖形態の特異的ヌクレオチド認識配列を提供することにより、制限エンドヌクレアーゼが放出をもたらすために使用され得る。IIS型制限エンドヌクレアーゼは、この課題に特に適切である。なぜなら、IIS型制限エンドヌクレアーゼの認識配列は、開裂部位から離れており、それにより認識配列を回収タグ結合化合物として役立つポリヌクレオチド内に配置することを可能にするからである。結合した配列決定ラダーまたはアプリコンの回収タグ結合化合物からの放出をもたらすために、回収タグー回収タグ結合化合物相互作用の二本鎖領域に特異的な他のヌクレアーゼを使用し得る。配列決定ラダーのヌクレアーゼ抵抗性ヌクレオチド（またはヌ

クレオチド アナログと、回収タグおよび／または回収タグ結合化合物のヌクレアーゼ感受性ヌクレオチド（またはヌクレオチド アナログ）との組み合わせは、放出のために適切なヌクレアーゼの範囲を増加させるのに使用され得る。本発明の別の実施態様では、配列決定ラダー ポリヌクレオチドの放出は、酵素的に触媒された化学反応ではなく従来の化学反応により達成され得る。例えば、アルカリ性環境への曝露により切断（そしてそれゆえ放出）を提供するために、回収タグおよび回収タグ結合化合物にリボヌクレオチド（デオキシリボヌクレオチド

とは対照的に)が組み込まれ得る。抗体が回収タグ結合化合物として使用される場合、放出は、高い塩濃度、温度上昇、またはpH調整により影響され得る。他の実施態様では、回収タグ結合化合物と固相支持体との間の結合(代表的には、共有結合)を切断することにより、回収タグは固相支持体より放出され得る。

本発明の好ましい実施態様では、回収タグおよび回収タグ結合化合物はポリヌクレオチドである。ポリヌクレオチド回収タグの放出は、好ましくは変性により達成される。類似の変性条件下で、同時に放出され得る回収タグのセットを使用すると、放出工程に必要とされる機器取扱いは大いに単純化される。なぜなら、結合回収タグの各々に対して別々の変性環境を提供する必要がないためである。同じかまたは類似の変性条件または放出条件で放出され得る回収タグを有する回収可能なプライマーのセットは、本明細書中において、回収可能なプライマーの「統合(integrated)」セットとして言及される。プライマーの統合セットを提供するため、互いに15℃、好ましくは10℃、より好ましくは互いに5℃以内にある $T_m$ を有するように、プライマー上の回収タグを選択する。 $T_m$ は、固定化回収タグ結合化合物と回収タグとの間で測定される時の変性温度である。 $T_m$ は経験的か、または $T_m$ 算出のために経験的に決定される式を参考として決定され得る。このような式の例は、他の箇所の中でも、BergerおよびKimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Academic Press, San Diego(1987), CantorおよびSchimmel, Biophysical Chemistry, Part III: The Behavior of Biological Macromolecules, W.H. Freeman, NY, (1980), Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag, New York(1989)などに見出され得る。回収可能なプライマーの統合セットの使用は、多重性配列決定アッセイまたは多重性増幅アッ

セイのためのキットに特に有用である。例えば、回収可能なプライマーの統合セットは、遺伝病と関連したいくつかの遺伝子座を同時に配列決定するのに使用され得る。同様に、回収可能なプライマーの統合セットは、回収可能なプライマーから生成された複数のポリヌクレオチド増幅産生物を分離する本方法に関連して使用され得る。

回収タグの回収タグ結合化合物への結合を提供するために、本方法は、1つ以

上の固定化回収タグ結合化合物を含む固相支持体を使用し得、このような固相支持体は、本明細書中において、ポリヌクレオチド回収デバイスとして言及される。本明細書中において使用される用語「固相支持体」は、単一の構造物、およびビーズまたは繊維の収集物のような個々の成分の収集物の両者を含む。本方法およびデバイスに使用するための固相支持体は、金属、ポリマー（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリアクリルアミドなど）、ガラス、またはポリサッカライド（例えば、アガロース、セルロース）を含むが、これらに限定されない種々の材料から形成され得る。固相支持体は、回収タグ結合化合物の固定化に適合性であるように選択した材料または複数の材料から形成され得る。回収タグ結合化合物は、アドレスを指定できるような様式で固相支持体上に固定化される。用語「アドレスを指定できる（addressable）」は、所望の回収タグが特定の位置、すなわち固相支持体上の「アドレス」を選択することにより（または、特定の固相支持体ユニットを選択することにより）見出され得るように、支持体上の回収タグの位置が予め決められていることを示すのに使用される。固相支持体に関して本明細書中で使用される用語「アドレスを指定できる」は、回収タグ結合化合物または支持体上に均等に分配されている複数の化合物を含む、ビーズおよび他の類似の固相支持体ユニットを含む。各回収タグ結合化合物は、固相支持体上に独特の位置を有する（または独特の固相支持体に結合している）。同じ支持体上に固定化された複数の回収タグ結合化合物を有する本発明のこれらの実施態様において、異なる回収タグ結合化合物は、固相支持体上で互いに切り離されている。異なる回収タグ結合化合物は、好ましくは、回収タグ結合化合物を欠如する固相支持体の領域により互いに切り離されている。本発明の1つの実施態様では、ウェル充填ゲル櫛状物のような複数突起物電気泳動充填デバイスを

固相支持体として使用し得る。適切な複数突起物電気泳動充填デバイスには複数の突起物があり、各突起物には、各突起物上に固定化された異なる回収タグを有する。本発明の他の実施態様では、固相支持体は、別々の空間的にアドレスを指定できる回収タグ結合化合物を含むプレーナー「チップ」の形態を取り得る。チ

ップ上の所定の位置でオリゴヌクレオチドを合成するための技術は、米国特許第5,527,681号；同第5,424,186号；同第5,143,854号；同第5,405,783号；同第5,445,934号；および同第5,510,270号に見出され得る。本発明の別の実施態様では、いくつかのビーズの収集物、好ましくは多孔性の巨視的ビーズが固相支持体として使用され、ここでビーズの各々は独特の固定化した回収タグ結合化合物を含む。巨視的ビーズ、したがって回収タグ結合化合物は、色分け、記号、トランスポンダー 標識、形状、サイズ、磁気標識、密度などのような、ある同定標識を各ビーズ（または類似のビーズ収集物）上に提供することにより互いに識別され得る。あるいは、ビーズ上に固定化した配列決定ラダーより得られたポリヌクレオチド配列情報に基づいて（または増幅産生物のサイズより）、ビーズは互いに識別され得る。ビーズは、球形、立方体、ピラミッド形、平面状または不整形を含む、種々の形状のいずれかをとり得る。好ましくは、ビーズは、回収タグ含有溶液とビーズとの間の接触を最大限にするために、小容量に複数のビーズを詰め込むことを容易にする形状およびサイズである。巨視的ビーズに加えて、区別して標識した微視的ビーズもまた使用され得る。微視的ビーズと巨視的ビーズとの識別は、ビーズを物理的に操作し得る方法を表わしている。一般に、巨視的ビーズは、個々のビーズの操作を容易にさせるサイズであり、一方、微視的ビーズは個々のビーズの簡便な操作を可能にするにはあまりにも小さいが、磁性移動または遠心分離法のような技術により集団として操作され得る。一般に、巨視的ビーズは約0.5mmと5mmとの間の近似平均直径（最大寸法）を有し、1mmから3mmの範囲が好ましい。微視的ビーズは、一般に、平均直径が0.5mmよりも小さい。

配列決定ラダーの回収タグ（または増幅産生物、すなわちアンプリコン）は、複数の配列決定ラダー（または増幅産生物）上の回収タグを、ビーズのような異なる固相支持体上に固定化した異なる回収タグ結合化合物に逐次的に結合することにより、互いに切り離され得る。例えば、各ラダーが独特の回収タグを有する

4種類の配列決定ラダーを含む組成物は、複数の巨視的ビーズ（磁性かまたはそうでないもの）とともにインキュベートされ得、ここで各ビーズは、配列決定ラダーのうちの1つの上の回収タグに特異的な固定化した回収タグ結合化合物を含

む。回収タグに結合しているビーズは、続いて除去される。次いで、非特異的に結合したポリヌクレオチドを取り除くために除去されたビーズを洗浄し得る。次いで、異なるビーズに固定化され、第1ビーズと同じ配列決定ラダー含有組成物に導入された第2、第3および第4の回収タグ結合化合物についてこのプロセスを繰り返す。洗浄プロセスを完了した後、回収タグは放出され得る。逐次的な回収の別の実施例では、固定化回収タグ結合化合物を含むビーズは、回収可能な配列決定ラダー（または増幅産生物）を含む第1溶液と接触し、溶液から除去され、洗浄され、そして回収可能な配列決定ラダー（または増幅産生物）を含む第2溶液と接触し、溶液より除去される。ビーズから回収タグが放出されるまで、このような段階を数回繰り返し得る。

本発明のポリヌクレオチド回収デバイスでは、回収タグ結合化合物は、回収タグ結合化合物とそれらの各自の回収結合タグとの相互作用を可能にするような様式で固相支持体に結合される。種々の技術は、回収タグ結合化合物を固相支持体上に固定化するために使用され得る。選択する特定の技術は、回収タグ結合化合物および固相支持体材料の選択に依存する。タンパク質およびポリヌクレオチドを固定化する技術は、分子生物学の当業者には周知である。例えば、タンパク質はホルムアルデヒド、DMS（ジメチルスベリミデート）、および還元的アミノ化により固相支持体に結合され得る。ポリヌクレオチドは、1,3-ジアミノプロパン、3,3'-イミノビスプロピルアミン、EDC（1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩）、SPDP（N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオプロピオネート））およびSATA（N-スクシンイミジル S-アセチルチオアセテート）のような薬剤により、固相支持体に結合され得る。オリゴヌクレオチドを固相支持体に連結する部分の例は、Ponら、Biotechniques, 6:768-775(1988)；Webb, 米国特許第4,659,774号；Baranyら、PCT特許出願PCT/US91/06103；Brownら、J. Chem. Soc. Commun. 1989:891-893；Dahmaら、Nucleic Acids Res. 18:3813-3821(1990)；Beattieら、Clinical Chemistry, 39:719-722(1993)；MaskosおよびSouthern, Nucleic Acids Res., 20:1679-1684(1992)に見出され得る。回収タグ結合化合物は、直接的または間接的のいずれかの連結に

より支持体に結合され得る。用語「直接的連結」は、リンカー（および必要に応じて、スパーサーアーム）を介しての共有結合を含む、固相支持体への回収タグ結合化合物の共有結合をいう。用語「間接的連結」は、特異的結合対、例えば、ビオチン-アビジン（またはストレプトアビジン）対を介しての固相支持体への回収タグ結合化合物の結合をいい、ここで、対の一方のメンバーは回収タグ結合化合物に連結され、そして対の他方のメンバーは固相支持体に連結される。

複数の配列決定ラダーを同時に生成し、続いてラダーを分離する方法を提供することに加えて、本発明はまた、同時に生成された複数のポリヌクレオチド増幅産生物を分離するための方法を提供する。本ポリヌクレオチド増幅産生物分離方法は、回収可能な配列決定ラダーではなく回収可能なポリヌクレオチド増幅産生物を生成するために、本多重性配列決定ラダー生成および分離方法を改変することにより実施され得る。ポリヌクレオチド増幅法は当業者には周知である。ポリヌクレオチド増幅の詳細なプロトコルは、他の箇所の中でも、DleffenbachおよびDveksler, PCR Primer, A Laboratory Manual, Coldspring, Harbor Press, Coldspring, Harbor, NY (1995) ; McPhersonら, PCR A Practical Approach, 第1巻, IRL Press Oxford, England (1991) ; McPhersonら, PCR A Practical Approach, 第2巻, IRL Press Oxford, England (1995) ; 米国特許第4,683,202号、米国特許第483,195号および米国特許第4,965,188号に見出され得る。さらに多重性PCRの詳細なプロトコルは、他の箇所の中でも、Shuberら, Genome Research, 5:488-493(1995) ; Eggerding, PCR methods and Applications, 4:337-345(1995) ; Cuppensら, Molecular and Cellular Probes, 6:33-39(1992)および米国特許第5,582,489号に見出され得る。複数の同時に生成されたポリヌクレオチド増幅産生物を分離する本方法は、ポリヌクレオチド増幅反応の実施を含み、ここで、一对の増幅プライマーの少なくとも1つのメンバーは回収可能な増幅プライマーである。一对の増幅プライマーの両メンバーが回収可能なプライマーである場合、生成した増幅産生物は2種類の回収タグを有する。一对の増幅プライマーの両メンバーが回収可能なプライマーである場合、回収タグは同じか、または互いに異なり得る。本発明はまた、個々の増幅フラグメントの単離ではなく、

選択されたセットの核酸増幅フラグメントの単離を提供するように、回収タグおよび回収タグ結合化合物が選択され得る実施態様を含む。一般に、複数の同時に生成されるポリヌクレオチド増幅産物を分離する本方法(多重性PCRまたは類似の増幅技術を介する)は、回収タグを有する複数の回収可能な増幅プライマーを複数の増幅鋳型と混合する工程を含む。混合工程後、各産物が回収タグを有する、複数の増幅産物を形成するために、少なくとも1つの回収可能なプライマーを使用して増幅鋳型を増幅し、ここで、増幅反応は単一の反応容器内にある。次に回収タグ、したがって増幅産物は、空間的にアドレスを指定できる様式での固相支持体上に固定化された回収タグ結合化合物への結合が可能となる。続いて、結合した増幅産物は、回収タグ結合化合物から放出される。

本発明はまた、核酸増幅反応間に複製され得ないオリゴヌクレオチド回収タグを有する回収可能なプライマーを提供する。したがって、そのようなプライマーがポリヌクレオチド増幅反応に使用される場合、回収タグオリゴヌクレオチドに相補的な伸長産物は生成されない。これらの回収可能なプライマーは、本明細書中において「ヒンジプライマー」として言及される。回収タグを含む二本鎖ポリヌクレオチドを変性する(または再生することを妨げる)必要がないため、本明細書中において記載されるように、ヒンジプライマーは、多重性ポリヌクレオチド増幅において特に有用である。相補的なオリゴヌクレオチドである回収タグ結合化合物への回収タグオリゴヌクレオチドの結合を提供するために。核酸増幅間に複製され得る回収タグを含む回収可能なプライマーは、ポリヌクレオチド増幅のプロセス間に回収タグ配列に相補的なポリヌクレオチド配列を生成する。この相補的な配列は、回収タグの固定化回収タグ結合化合物(例えば、固定化相補的オリゴヌクレオチド)への結合と有意に競合し得る。したがって、ヒンジプライマーは本発明の多くの方法において有利に使用され得、ここで固相支持体上に固定化される化合物への結合を介して、増幅産物を効率的に回収することが望ましい。

ヒンジプライマーは、核酸増幅反応間にDNAポリメラーゼにより複製され得ないオリゴヌクレオチド回収タグを有する回収可能なプライマーである。回収タグ

として使用され得、そして核酸増幅反応間に複製され得ない多くの異なるオリゴヌクレオチドが存在する。ヒンジプライマーの1つの実施態様において、回収タグは、増幅反応において使用されるDNAポリメラーゼにより複製され得ないオリゴヌクレオチドアナログである。このような非複製可能オリゴヌクレオチドアナログの例は、ペプチド-核酸(PNA)などを含むが、これらに限定されない。PNAの合成および構造は、他の場所の中でも、(Egholmら、J. Am. Chem. Soc. 114:1895-1897(1992); Kosynkinaら、Tet. Lett. 35:5173-5176; Dueholmら、J. Org. Chem. 59:5767-5773(1994))に記載される。ヒンジプライマーの別の実施態様において、回収タグは、DNAポリメラーゼにより複製され得るが、回収タグを、回収可能なプライマーの鋳型-アニーリング配列部分に結合させる、非複製可能リンカーによりブロックされるオリゴヌクレオチドであり得る。このような非複製可能リンカーは、オリゴヌクレオチドアナログであり得る。あるいは、本発明のいくつかの実施態様において、非複製可能リンカーは、天然に存在するポリヌクレオチドにほとんどまたは全く構造類似性を有し得ない。オリゴヌクレオチドアナログである非複製可能リンカーの例は、ポリ5'→3'デオキシリボース(すなわち、ヌクレオシド塩基のないDNA)、ペプチド核酸などを含む。オリゴヌクレオチドアナログでない非複製可能リンカーの例は、ポリエチレングリコール、炭化水素などを含む。リンカーをポリヌクレオチドに結合する方法は当業者に周知であり、そのような結合技術の例は、Hermanson, Bioconjugate Techniques, 前出に見い出され得る。代表的には、非複製可能リンカーは、ヒンジプライマーの鋳型アニーリング領域の5'末端に位置し、それにより伸長反応を触媒するDNAポリメラーゼの活性への妨害を最小化する。本発明の代替の実施態様において、回収タグのプライマーへの付着部位(または配向)によって、例えば、5'末端プライマー以外の位置で、ヒンジプライマーの回収タグは、増幅反応において非複製可能にされ得る。

本発明はまた、ヒンジプライマーを使用する、ポリヌクレオチド増幅の方法を提供する。ヒンジプライマーの特性を十分に利用するように、これらの増幅方法を多重性化し得る。本方法は、ポリヌクレオチド増幅条件下で、少なくとも1つのヒンジプライマーを、増幅のための1つ以上のポリヌクレオチドテンプレート



と混合する工程を包含する。一般に、本発明の多重性化ポリヌクレオチド増幅反応における他の回収可能なプライマーと同じように、ヒンジプライマーを使用し得る。

本発明の先述の説明は、主に多重性化ポリヌクレオチド増幅のための回収可能なプライマーの使用に関するが、本方法を回収可能なプライマーなしの使用に容易に適用し得ることは当業者によって理解される。回収タグなしのオリゴヌクレオチドプライマーは、回収可能な配列決定ラダーまたは回収可能なポリヌクレオチド増幅産物を生成するために使用され得；これらの方法は、「非回収タグ多重性方法」として言及される。非回収タグ多重性方法は、回収タグの機能的な等価物を使用する。本発明の方法の非回収タグに基づく多重性方法の実施態様において、配列決定ラダー生成、またはポリヌクレオチド生成プロセスのいずれかの間に新たに形成されるポリヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズし得るポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドである、回収タグ結合化合物を使用することにより、回収タグのないプライマーを回収可能なプライマーに置換し得る（図1Dおよび1Eを参照のこと）。これらの新たに生成されたポリヌクレオチド配列は、プライマー配列以外のポリヌクレオチドラダーまたはアンプリコンの部分である。そのようなプライマーを使用するための適切な回収タグ結合化合物は、新たに合成したポリヌクレオチド、または新たに合成したポリヌクレオチドと、プライマーの3'末端に最隣接するプライマーポリヌクレオチドとの組み合わせのいずれかに特異的に結合し得る。プライマーを含むポリヌクレオチド鎖に相補的なポリヌクレオチド鎖上にある、新たに生成されたポリヌクレオチド配列に結合するように、回収タグ結合化合物を設計し得る。例えば、回収タグ結合化合物は、増幅プライマーの1つとともに二重鎖を形成するアンプリコン中のポリヌクレオチド配列に相補的なポリヌクレオチドであり得る。本発明の前述の実施態様における使用のための回収タグ結合化合物を設計するために、新たに生成された配列の一部に関する配列情報は、公知であるか、または推定されていなければならない。非回収タグに基づく多重性方法は特に有用である。なぜなら、この方法は、「ユニバーサル」鋳型-アニーリング配列を有するプライマーが、本発明の多重性化配列決定および核酸増幅法において使用されることを可能にするためで

ある。用語「ユニバーサル」は、プライマーがアニーリングする鑄型の領域が複数の鑄型に共通しているために、プライマーの所定の鑄型-アニーリング領域が広範囲の鑄型を使用し得ることを示すために使用される。

本発明はまた、ポリヌクレオチド回収デバイスを提供する。本発明のデバイスは、回収タグ（または回収タグの機能的な等価物）の回収タグ結合化合物への結合を提供することにより、本発明の方法を容易にするように設計される。本発明のポリヌクレオチド回収デバイスは多くの回収タグ結合化合物を含むが、ここで回収タグ結合化合物の各々は、アドレスを指定できる様式で固相支持体に固定化される。同じデバイス上に存在する異なる回収タグは、互いに分離され、好ましくは固相支持体培地により分離される。一般に、異なる回収タグ結合化合物は、等量で存在する；しかし、異なる特定の結合ペア間での結合親和性における差異を説明するために、異なる回収タグ結合化合物の量が規格化され得る。回収タグ結合化合物を、規則的な配列で、互いに一定に分離し得る。本発明の別の実施態様において、固相支持体は、キャピラリーチャンネルの配列である（図4）。キャピラリーチャンネルは、互いに平行に位置している。キャピラリーチャンネルは、キャピラリーチューブの形態か、または個々のキャピラリーチューブではなく、ブロックのチャンネルであり得る。好ましくは、キャピラリーチャンネルは、すべての次元において互いに同一である。必ずしもそうでないが、代表的にはキャピラリーチャンネルの直径は25~75  $\mu\text{m}$ の範囲内にある。交換可能な横断面積を有するキャピラリーチャンネルを使用し得る。好ましくは、チャンネルは、その長さに沿って一定の直径である。各キャピラリーチャンネルは、入力ポート10および出力ポート20を有する。各キャピラリーチャンネルは、電気泳動分離の連続的な経路を形成する。入力ポートは、分離のためのポリヌクレオチドの導入用である。出力ポートは、分離されたポリヌクレオチドの除去を提供するように、そして電気泳動のための電流経路提供するように作用する。本発明のポリヌクレオチド回収デバイスは、多くの回収タグ結合化合物を含み、ここで回収タグ結合化合物の各々は、キャピラリーチャンネルの入力ポートに近接して固定化される。回収タグ結合化合物は、入力ポート内に固定化され得るか、または入力ポートに隣接して固定化され得る。各入力ポートは、異なる回収タグ結合化合物を有する。好

ま

しくは、回収タグ結合化合物はポリヌクレオチドである。

本発明のポリヌクレオチド回収デバイスの別の実施態様において、固相支持体は、多くのウェル充填部材を有するゲルコームのような複数プロジェクション電気泳動ロードデバイスである（すなわち、プロジェクションはウェル充填部材である）（図3C）。ポリヌクレオチドを電気泳動ゲルに導入するために、プロジェクションを使用し得る。各ウェル充填プロジェクションは、回収結合タグ化合物が回収結合タグに結合することを可能にするために、そのような方法でプロジェクションの表面に付着した、少なくとも1つの回収タグ結合化合物を含む。ウェル充填プロジェクションは、同じか、または異なる回収タグ結合化合物を有し得る。従って、本発明の複数プロジェクション電気泳動ロードデバイスのプロジェクションと、回収可能なプライマーから合成された、複数の配列決定ラダーまたはポリヌクレオチド増幅産物を含む反応混合物とを接触させることにより、異なる配列決定ラダーまたは増幅産物を分離し、精製し、そして異なるプロジェクション上で固定化し得る。デバイスの形状をプロジェクションの形状に適合させるために、本発明の複数プロジェクション電気泳動ロードデバイスは、1つ以上の柔軟性の領域を含み得る。本発明の複数プロジェクション電気泳動ロードデバイスの他の実施態様において、プライマー伸長反応が実施されるウェル（または他の液体容器）と合うように、プロジェクションの位置を定める。例えば、配列決定反応を96ウェル（8×12）マイクロタイタープレートのウェルで実施する場合、ウェルからポリヌクレオチド反応産物を取り出し、それらを電気泳動分離デバイスに移すために、8×12の配列で、96プロジェクションを有する複数プロジェクション電気泳動ロードデバイスを使用し得る。

本発明のポリヌクレオチド回収デバイスの他の実施態様は、巨視的ビーズのような2つ以上の容易に操作される固相支持体ユニットのセットを含むが、各ユニットは、1つ以上の回収タグ結合化合物を有する。同じユニット上に複数の異なる回収タグ結合化合物を有するこれらのユニットセットの実施態様において、異なる回収タグ結合化合物は、互いに分離されても分離されなくてもよい。ユニッ

トは、同定標識(例えば、色、数字、または標識)を有し得る。セットの個々のユニットは、セットの各メンバーの簡便な操作を提供するために、互いに結合され

得る。ユニットは、柔軟性コネクターにより互いに結合され得るが、そのようなコネクターは、回収タグを含む溶液(単数または複数)から固相支持体を除去した後、簡便に破壊され得る。例えば、ポリヌクレオチド回収デバイスは、「ストリング(string)」(真珠のストリングと類似している)上で互いに結合した巨視的なビーズの形態を取り得る。従って、溶液を含む回収タグから結合したビーズの1つを引き抜くことは、溶液からすべてのビーズを引き抜くことになる。個々のビーズ間の結合は選択的に切断され得、それによって個々のビーズの制御された操作を提供する。

本発明はまた、本発明の方法の実施を促進するように設計されたキットを提供する。キットは、本方法の実施に必要とされる2つ以上の成分をアセンブリすることにより、目的の方法の実施を促進するに役立つ。キットは、好ましくは、キットのエンドユーザーによる測定の必要性を最小化するため、予め測定されたユニット量で成分を含有する。キットは、好ましくは、本発明の1つ以上の方法を実施するための説明書を含む。好ましくは、互いに協同して操作するため、キットの成分は最適化される。本発明のキットを使用して、複数の増幅産物または配列決定ラダーを生成および／または分離し得る。本発明のキットは、複数の回収可能な配列決定ラダーまたは回収可能な増幅産物を生成するように適合した、少なくとも2つのプライマーのセットを含む。好ましくは、本発明のキットのプライマーセットは、回収可能なプライマーの統合セットである。本発明のキットのプライマーは、別々に供給されるか、または同じ溶液で供給され得る。回収可能なプライマーは標識化されても標識化されなくてもよい。複数の回収可能な増幅産物を生成するためのキットは、少なくとも2つのペアの増幅プライマーを含むが、各ペアの少なくとも1つのメンバーは回収可能なプライマーである。回収可能なプライマーを含むことに加えて、本発明のキットはさらに、回収タグを含まないプライマーオリゴヌクレオチドを含む。複数の回収可能な配列決定ラダーまたは回収可能な増幅産物を生成するための本発明のキットはさらに、キットのプ

ライマーを使用して生成した、回収可能なポリヌクレオチド増幅産物または回収可能な配列決定ラダー上に存在する回収タグ（またはその機能的等価物）に特異的に結合するように選択した、回収タグ結合化合物を含み得る。回収タグ結合化

合物は、遊離溶液中に供給され得るか、またはポリヌクレオチド回収デバイスに固定化して供給され得る。本発明のキットはさらに、ポリヌクレオチド配列決定または増幅に必要とされるさらなる試薬を含み得る。このような試薬は、濃縮反応緩衝液、dNTP（ヌクレオチド3リン酸型の4塩基すべて）、鎖ターミネーター（色素標識化か、または標識化されない）、および熱安定DNAポリメラーゼを含む。本発明のキットはさらに、本発明のポリヌクレオチド回収デバイス、またはポリヌクレオチド回収デバイスに容易に変換され得る固相支持体（例えば、アビジンで被覆されているウェル充填電気泳動ゲルコーム）を含み得る。

先に記載されている本発明は、以下の実施例を参照とすることにより良好に理解され得る。これらの実施例は、本発明を例示するために提供され、そして本発明に対する限定として解釈されるべきではない。

### 実施例

#### 実験番号 1

#### テンプレート特異的プライマーを用いる3つの異なるテンプレートの多重性プライマー配列決定。

3つの異なるプラスミド（すなわち、pGEM、pCDNA II 1.9、およびpBSK）を、ジデオキシ配列決定方法（Sangerら、74 roc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 5463, 1977）を用いて同時に配列決定した。

用いた配列生成プロトコルは、本質的に、FAM-SP6（すなわち、FAM標識SP6プライマー）（A、C、およびG反応）またはROX-SP6（すなわち、ROX標識SP6プライマー）（T反応）（pGEMに特異的）、JOE-25T（C）（すなわちpCDNA II 1.9に特異的なJOE標識25T（C）プライマー）、およびTAMRA KS（pBSKに特異的）プライマーを全て、A、C、G、Tストック溶液のそれぞれに添加したこと以外はABI PRISM Dye Primer Cycle Sequencing Core Kit, FSマニュアル（PN402114）に記載された通りであった。

プライマー配列は以下の通りであった：

SP6 : 5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG 3' [配列番号1]

25T(C) : 5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TC 3' [配列番号2]

KS : 5' CCT CGA GGT CGA CGG TAT CG 3' [配列番号3]。

全てのテンプレート (pGEM、pCDNA II 1.9、およびpBSK) を、他の点では配列決定化学を改変することなく各多重性反応物に添加した。サイクル後、A、C、G、およびT配列決定混合物は合わせず (プロトコルに記載される通り)、しかし別々にエタノール沈澱し、そしてABI 373 DNAシーケンサーを用いて配列決定ゲルで電気泳動的に分析した。

結果は、A、C、G、およびTレーンの各々において、3つ全ての1色配列決定ラダーが同時に検出されたことを示した。1回に1色を選択し、そしてゲルを横切ってA、C、G、およびTレーンを合わせることにより、全てのテンプレートについて良好な配列決定データが得られた。このことは、3つ全ての反応が、明らかな干渉を伴うことなく同時に起きたことを実証する。

## 実験番号2

5の異なるテンプレートを標的化する12の異なるテイル配列決定プライマーを用いる多重性ターミネーター配列決定、それに続く配列決定ラダーの連続的な選択的とじ込み

5つの異なるテンプレートの複数配列決定反応、続いて固相支持体上の相補的捕獲配列を使用する選択的ハイブリダイゼーションベースプルアウト (pull-out) を行う。

12のプライマーの内の7つ (MC12-F2、-F3、-F4、-F5、-F6、-RC1、-RC2) を、MC12Blue Scriptベクター (全体の挿入物を含む約3000bpフラグメント) のPCR産物における連続領域を標的化するように設計し、その結果、産生された配列決定伸長産物 (約400~700塩基長) の配列が生じた。別のプライマー (5B5F5) は、5B5ベクターの挿入物の一部を標的化し、一方、残りのプライマー (MSH2-7、-12、-13、-15) を、ヒトゲノムDNA (MSH2遺伝子のエキソン、7、12、13、15) から短いPCR産物 (約200~500bp) を配列決定するために設計した。全てのテンプレートを、ダイデオキシ配列決定法を用いて同時に配列決定した (Sangerら、

74 Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 5463, 1977)。

用いたプロトコルは、配列決定用試薬の濃度およびサイクルパラメーターを、

同じ条件下で全てのテンプレートの上首尾な配列決定を保証するために最適化したことを除いて、本質的にABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Coreキット、FSマニュアル (PN402116) に記載されるとおりであった。2倍濃度の配列決定用緩衝液 (約80mM) および3倍濃度のポリメラーゼ (約0.053  $\mu$ M) およびピロホスファターゼ (3 Unit)、dNTP (約2.4mM) およびダイターミネーター (約1.2mM) を、1重反応について薦められるのと比較して、12重 (すなわち、12倍の多発的配列決定) について使用した。総マグネシウム濃度は、約7mMであり、そして反応の総容量は30  $\mu$ lであった。テンプレート濃度は、それぞれ、MC12 PCRアンプリコンについては約0.013  $\mu$ Mであり、5B5クローンについては約0.02  $\mu$ Mであり、そしてMSH2 PCRアンプリコンの各々については約0.01  $\mu$ Mであった。プライマー濃度は、約1.2  $\mu$ Mの総濃度で、0.05~0.17  $\mu$ Mの範囲であった。サイクル数および温度は (96°C 5秒--53°C 10秒--60°C 4分) であった。25の5サイクルを行った。このサイクルの終わりに、チューブを8分間99.9°Cに加熱して、全ての酵素活性を破壊した。

配列決定用プライマー (回収可能なプライマー) の各々を、ユニークな6塩基DNAリーダー配列 (すなわち、バランシング配列、5'末端に存在する) を有するように合成した。バランシング配列は、配列決定用テンプレートにハイブリダイズしなかった。12の異なる6塩基リーダー配列の塩基組成を、融点が全てのプライマーに類似し、プルアウト配列に相補的であるように設計した。プルアウト相補性配列 (すなわち、回収タグ結合化合物) は、15塩基長であり、そして6マーのリーダー配列+この6マーに隣接して位置するアニーリング領域の9塩基に相補的であるように設計した。プルアウトオリゴは、付着した3' ビオチンを有し、その結果、それらは、ビオチン/ストレプトアビジン結合を介して固相支持体に結合し得た。このような系は、ハイブリダイゼーション、洗浄および溶出の工程の間に特異的にハイブリダイズした配列決定用伸長産物を分離し、そして容易に操作することを可能にする。

回収可能なプライマーおよび回収タグ化合物の配列は以下のとおりであった：

- 1) MC12-F2: 5' TTG GCT (フィル) ACT TAG TGC ATA TTT TAA CGG TAC 3' (プライマー) [配列番号 4]  
5' GCA CTA AGT AGC CAA 3' (捕獲配列) [配列番号 5]
- 2) MC12-F3: 5' CTC TCT (フィル) CCC AAG AGC AGT TAC ATT ACA AGG 3' (プライマー) [配列番号 6]  
5' GCT CTT GGG AGA GAG 3' (捕獲配列) [配列番号 7]
- 3) MC12-F4: 5' GGG TTT (フィル) ATT CAG TGG TAC CCC TAC TCA GAG 3' (プライマー) [配列番号 7]  
5' CCA CTG AAT AAA CCC 3' (捕獲配列) [配列番号 8]
- 4) MC12-F5: 5' CCA CCT (フィル) AAA TAA GCT TTA ATG TAA AAT ATG 3' (プライマー) [配列番号 9]  
5' AGC TTA TTT AGG TGG 3' (捕獲配列) [配列番号 10]
- 5) MC12-F6: 5' GAA GCT (フィル) TCT TCT AAA AAG TAC TAA TGT TTG 3' (プライマー) [配列番号 11]  
5' TTT AGA AGA AGC TTC 3' (捕獲配列) [配列番号 12]
- 6) MC12-RC1:  
5' AGA GAG (フィル) TGT TAT AGA ATC TTC ATG GAC ATC 3' (プライマー) [配列番号 13]  
5' ACT ATA ACA CTC TCT 3' (捕獲配列) [配列番号 14]
- 7) MC12-RC2:  
5' AAT TAA (フィル) ATG GTC CTA GTT AAT AAA GAT CAC 3' (プライマー) [配列番号 15]  
5' TAG GAC CAT TTA ATT 3' (捕獲配列) [配列番号 16]
- 8) SB5-F5: 5' ATC AGG (フィル) TAA CAG TCA TCA TAT TCT GTA TGC 3' (プライマー) [配列番号 17]  
5' TGA CTG TTA CCT GAT 3' (捕獲配列) [配列番号 18]
- 9) MSH-7: 5' ATT AGA (フィル) CGA CTT AGT TGA GAC TTA CGT GC 3' (プライマー) [配列番号 19]  
5' ACT AAG TCG TCT AAT 3' (捕獲配列) [配列番号 20]
- 10) MSH-12: 5' GAA GCA (フィル) TCA GTA TTC CTG TGT ACA TTT 3' (プライマー) [配列番号 21]  
5' GAA TAC TGA TGC TTC 3' (捕獲配列) [配列番号 22]



11) MSH-13: 5' GCG ATA (プライマー) GTA GCA GAA AGA AGT TTA AAA CTT GC 3'  
 (プライマー) [ 配列番号 23]

5' TTC TGC TAC TAT CGC 3' ( 捕獲配列 ) [ 配列番号 24]

12) MSH-15: 5' AGA CAT (プライマー) TGC TGT CTC TTC TCA TGC TG 3' (プライマー)  
 [ 配列番号 25]

5' GAG ACA GCA ATG TCT 3' ( 捕獲配列 ) [ 配列番号 26]

配列決定反応を行った後に、12の配列決定ラダーの各々を、選択的ハイブリダイゼーションによって混合物の連続的プルアウトをした。ハイブリダイゼーション工程を以下ように行った。第1に付着した回収タグ結合化合物を有する固相支持体（ストレプトアビジン被覆シリカビーズ）を、10mM Tris、1 mM EDTA、pH 8.0、0.1% Tween20中で3回予備洗浄した；次いで、100mM Tris、1 mM EDTA、pH 8.0、2mM NaCl、0.1% Tween20にて1回予備洗浄した。次いで、ビーズを、32℃で30分間多重性配列決定反応でインキュベートした。一旦、カップリング反応が完了すると、チューブを手短に遠心分離してプルアウト複合体を有するビーズをペレット化し、そして配列決定反応物を次のハイブリダイゼーションチューブに移した。プルアウト複合体を有するビーズを、10mM Tris、1 mM EDTA、pH 8.0、0.1% Tween20中で2回；70%エタノール中で1回洗浄し；そして吸引乾燥させた。

電気泳動的分析の前に、ハイブリダイゼーション結合配列決定伸長産物を、60℃で4分間加熱することによって、2.5 μlの標準ローディング緩衝液（脱イオン化ホルムアミドおよびデキストランブルー/EDTA混合物5:1）中に放出した。

良好な配列決定データを、4つの全ての標的テンプレートについて得た。これらは、全ての反応が首尾良く同時に起こり、そして効率的に捕獲され得たことを示す。全体のシグナルは、約600塩基までの良好な正確度を保証するに十分であった。オーバーラップするプライマーの場合には、配列が続くプライマーのアニリングの領域に達したときに、シグナルは、強度において減少することを見出した（依然として重複性の配列決定情報を提供しながら）。非常に低いバックグラウンドノイズは、非特異的結合が存在しないことを示した。

実験番号 4

ヒンジPCRプライマーを使用する多重性PCR精製

多重性PCR反応のプルアウトに関するモデルとして、3つの個々のPCR反応物を

別々に行い、次いで1つのチューブに組み合わせた。1つのヒンジプライマーを、それぞれの3つの組みの増幅プライマーに使用した。反応産物を、ヒンジプライマー上の回収タグオリゴヌクレオチドに特異的なハイブリダイゼーションベースプルアウトを用いて選択的に精製した。PCRプロトコルは、本質的にPCR Protocols, Michael A. Innisら、1990、Academic Press Inc., 米国特許4,683,195および米国特許4,683,202、1987年7月に記載されるとおりであった。

3つの異なるPCR増幅を、AmpliTaq Gold<sup>TM</sup> DNA Polymeraseを有するGeneAmp<sup>TM</sup> PCR Reagentキット (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, PN# #N801-0055) で別々に行った。使用されるプロトコルは、PCR試薬の濃度およびサイクルパラメーターを首尾良い増幅を容易にするために最適化した以外は、本質的にPCRキットマニュアルにおいて記載されるとおりであった。

標準PCR反応条件を使用した；111ngのRaji細胞株DNA、200fMの正方向および逆方向プライマー、100nM dNTP混合物、175nM MgCl<sub>2</sub>、1×キットPCR緩衝液、2.5ユニットのAmpliTaq Gold<sup>TM</sup> ポリメラーゼおよび最終反応用量を50μlにする蒸留水。

PCRサーマルプロフィールを使用した；AmpliTaq Gold<sup>TM</sup> 酵素を活性化するための95℃-10分工程、次いで97℃-8秒 59℃-40秒 72℃-72秒の28サイクル、このサイクルに続いて、Taq Gold Enzymeを不活化するための99.9℃-10分の加熱、そして最終工程として保存のために反応を4℃に冷却する。

使用した3つの異なるPCRプライマーセットを、ヒトゲノムDNAの3つの個々の領域を増幅するために設計した。ヒトゲノムDNAの標的MSH-2領域を個々に産生し、短いアンプリコン産物を作製した(200-500bp)。各PCRプライマーセットからの1つのプライマーセットは、その3'末端からテンプレート特異的PCRプライマーの5'末端に付着した15塩基のオリゴヌクレオチドを有するヒンジ回収可能プライマーであった。各々のヒンジプライマーを構成する2つのオリゴヌクレオチドを、DNAポリメラーゼによって複製され得なかった「非DNA」リンカーユニットによって互いに物理的に連結させた。PCRプライマーに付着したユニークな15塩基

オリゴヌクレオチドは伸展され得ず、そしてPCRを触媒するために使用されるポリメラーゼ酵素のためのテンプレートにならなかった；それによって、単鎖プライマーの部分を残し、そして捕獲が可能であった（すなわち、固相支持体に付着した

相補的な15塩基オリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることが可能であった）

。

PCRプライマーセット：

エキソン7

エキソン7 ヒンジ正方向プライマー：

5'TTG GCT AGT TAG TGC3'-リンカー 5'CGA CTT AGT TGA GAC TTA CGT GC3'

回収タグ配列-リンカー-正方向プライマー

[配列番号27]

タグ結合配列：

5'GCACTAAGTAGCCAA3' [配列番号 28]

エキソン7 逆方向プライマー：

[配列番号29]

エキソン12

エキソン12ヒンジ正方向プライマー

5'GGG TTT ATT CAG TGG3'-リンカー 5'TCA GTA TTC CTG TGT ACA TTT3'

回収タグ配列-リンカー-正方向プライマー：

[配列番号30]

タグ結合配列：

5'CCACTGAATAAACCC3'

[配列番号31]

エキソン12逆方向プライマー：

5'TTA CCC CCA CAA AGC CCA A3'

[配列番号32]

エキソン13

エキソン13ヒンジ正方向プライマー：

5'CCA CCT AAATAAGCT3'-リンカー- 5'GTAGCAGAAAGAAGTTTAAAAC TT GC3'

回収タグ配列-リンカー-正方向プライマー [配列番号33]

回収タグ結合配列:

5'AGCTTATTTAGGTGG3' [配列番号 34]

エキソン13逆方向プライマー:

5'GGACAGAGACATACATTTCTATCTTC3' [配列番号 35]

増幅結果は、アガロースゲル電気泳動によって確認された。3つの異なるPCRアンプリコン反応を互いに混合した。相補性捕獲配列（すなわち、回収タグ結合化合物）を、1×TEおよび0.1% Tween-20溶液で2回予備洗浄し、遠心分離してビーズをペレット化し、そして洗浄液を除去した。多重性PCR混合物をチューブ中の捕獲ビーズの第1のセットに添加し、そして混合した。この反応混合物を80℃に2時間予熱し、次いで32℃に30分間インキュベートして冷却し、選択的ハイブリダイゼーションベース捕獲を可能にした。次いで、混合物を遠心分離してビーズをペレット化した。溶液を、次の特異的捕獲支持体チューブに移し、そしてハイブリダイゼーション反応を他のアンプリコンの各々について連続的に繰り返した。結合アンプリコンを有するビーズを、1×TEおよび0.1% Tween-20溶液中で2回、そして70%エタノール中で1回洗浄し、次いで高速吸引において吸引乾燥させた。支持体ビーズからの溶出において、捕獲されたアンプリコンを、ジデオキシ配列決定法（Sangerら、74 Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 5463, 1977）を用いて配列決定した。配列決定反応を、2 pMの特異的な配列決定プライマーを用いて、ABI PRISM<sup>TM</sup> Dye Terminator Cycle Sequencing Ready reactionキット（Perkin-Elmer, NorwalkCT, PN#402078）を用いて行った。使用した配列決定増幅サーマルプロファイルは、（96℃ 8秒-53℃15秒-60℃ 4分）25サイクルであった。良好な配列決定データを全ての3つの標的テンプレートについて得た。これらは、反応は、アンプリコンの多重性PCR混合物から十分な濃度および純度で首尾良く捕獲されたことを示した。全体のシグナルは、良好な正確度を提供するに十分で

あった。低バックグラウンドノイズは、捕獲からの非特異的結合が存在しないことを示した。個々のPCRプルアウト産物をまた、配列決定反応のテンプレートとしてそれらを使用する前にゲル電気泳動によって分析した。これにより、個々のPCR産物が捕獲されたことが示された。

#### 等価物

本明細書中に記載される全ての出版物および特許出願は、本発明が属する分野の当業者の技術を示す。全ての出版物および特許出願は、個々の出版物または特許出願が参考として援用されることが特別にそして個々に示されるのと同じ程度に参考として本明細書中に援用される。

前述の明細書は、当業者が本発明を実施することを可能にするに十分であると考えられる。実際、分子生物学の分野または関連する分野の当業者に明らかである、本発明を実施するための上記の様式の種々の改変は、以下の請求の範囲内にあることが意図される。

## 配列表

## (I) 一般的情報：

(i) 出願人：ザ パーキン エルマー コーポレーション

(ii) 発明の名称：多重性ポリヌクレオチド捕獲方法および組成物

(iii) 配列数：50

(iv) 連絡住所：

- (A) 名称：ピーイー アプライドバイオシステムズ
- (B) 番地：リンカーン センター ドライブ 850
- (C) 市：フォスター シティ
- (D) 州：シー エー
- (E) 国：アメリカ合衆国
- (F) 郵便番号：94404

(v) コンピューター読み出し形態：

- (A) 媒体型：ディスクット
- (B) コンピューター：IBM 互換用
- (C) OS：DOS
- (D) ソフトウェア：FastSEQ、ウインドウズバージョン2.0

(vi) 現在の出願データ：

- (A) 出願番号：PCT/US97/
- (B) 出願日：

(vii) 先願データ：

- (A) 出願番号：60/027,832 (アメリカ合衆国)
- (B) 出願日：1996年10月4日

(vii) 先願データ：

- (A) 出願番号：08/874,437 (アメリカ合衆国)
- (B) 出願日：1996年10月4日

(viii) 代理人／事務所情報：

- (A) 氏名：ボートナー, スコット アール
- (B) 登録番号：34,298
- (C) 照会／記録番号：4294W0

## (ix) 電話回線情報：

(A) 電話：415-638-6245

(B) テレファックス：415-638-6071

## (2) 配列番号1の情報：

## (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：18塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

## (xi) 配列：配列番号1：

ATTTAGGTCA CACTATAG

18

## (2) 配列番号2の情報：

## (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：26塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

## (xi) 配列：配列番号2：

TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTC

26

## (2) 配列番号3の情報：

## (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

## (xi) 配列：配列番号3：

CCTCGACGTC GACGGTATCG

20

## (2) 配列番号4の情報：

## (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：30塩基対



- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号 4：

TTGGCTACTT AGTGCATATT TTAACGGTAC

30

(2) 配列番号 5 の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：15塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号 5：

GCACTAAGTA GCCAA

15

(2) 配列番号 6 の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：30塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号 6：

CTCTCTCCCA AGAGCAGTTA CATTACAAGG

30

(2) 配列番号 7 の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：15塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号 7：

GCTCTTGGGA GAGAG

15

## (2) 配列番号 8 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 15塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 8 :

CCACTGAATA AACCC

15

## (2) 配列番号 9 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 30塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 9 :

CCACCTAAAT AAGCTTTAAT GTAAAATATG

30

## (2) 配列番号 10 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 15塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 10 :

AGCTTATTTA GGTGG

15

## (2) 配列番号 11 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 30塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 11 :

GAAGCTTCTT CTAAAAAGTA CTAATGTTTG

30

## (2) 配列番号 1 2 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 15塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号 1 2 :

TTTAGAAGAA GCTTC

15

## (2) 配列番号 1 3 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 30塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号 1 3 :

ACAGACTGTT ATAGAATCTT CATGGACATC

30

## (2) 配列番号 1 4 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 15塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号 1 4 :

ACTATAACAC TCTCT

15

## (2) 配列番号 1 5 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 30塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号15：

AATTAAATGG TCCTAGTTAA TAAAGATCAC

30

(2)配列番号16の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号16：

TAGGACCATT TAATT

15

(2)配列番号17の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：30塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号17：

ATCAGGTAAC AGTCATCATA TTCTGTATGC

30

(2)配列番号18の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号18：

TGACTGTTAC CTGAT

15

## (2) 配列番号 19 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 29塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号 19 :

ATTAGACGAC TTAGTTGAGA CTTACGTGC

29

## (2) 配列番号 20 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 15塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号 20 :

ACTAAGTCGT CTAAT

15

## (2) 配列番号 21 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 27塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号 21 :

GAAGCATCAG TATTCCTGTG TACATTT

27

## (2) 配列番号 22 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 15塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号 22 :

GAATACTGAT GCTTC

15

## (2) 配列番号 2 3 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 32塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号 2 3 :

GCGATAGTAG CAGAAAGAAG TTAAAACTT GC

32

## (2) 配列番号 2 4 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 15塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号 2 4 :

TTCTGCTACT ATCGC

15

## (2) 配列番号 2 5 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 26塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号 2 5 :

AGACATTGCT GTCTCTTCTC ATGCTG

26

## (2) 配列番号 2 6 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 15塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号26：

GAGACAGCAA TGTCT

15

(2)配列番号27の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：38塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号27：

TTGGCTAGTT AGTGCCGACT TAGTTGAGAC TTACGTGC

38

(2)配列番号28の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：15塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号28：

GCACTAACTA GCCAA

15

(2)配列番号29の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：21塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号29：

TTTATGAGGA CAGCACATTG C

21

## (2) 配列番号30の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 36塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号30:

GGGTTTATTC AGTGGTCAGT ATTCCTGTGT ACATTT

36

## (2) 配列番号31の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 15塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号31:

CCACTGAATA AACCC

15

## (2) 配列番号32の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 19塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号32:

TTACCCCCAC AAAGCCCAA

19

## (2) 配列番号33の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 41塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号33:



CCACCTAAAT AAGCTGTAGC AGAAAGAAGT TTAAAACTTG C

41

(2)配列番号34の情報:

(i)配列の特徴:

- (A)長さ:15塩基対
- (B)型:核酸
- (C)鎖の数:一本鎖
- (D)トポロジー:直鎖状

(xi)配列:配列番号34:

AGCTTATTTA GGTGG

15

(2)配列番号35の情報:

(i)配列の特徴:

- (A)長さ:26塩基対
- (B)型:核酸
- (C)鎖の数:一本鎖
- (D)トポロジー:直鎖状

(xi)配列:配列番号35:

GGACAGAGAC ATACATTCT ATCTTC

26

(2)配列番号36の情報:

(i)配列の特徴:

- (A)長さ:26塩基対
- (B)型:核酸
- (C)鎖の数:一本鎖
- (D)トポロジー:直鎖状

(xi)配列:配列番号36:

TAATATATTA TATAATATAT CGATTA

26

(2)配列番号37の情報:

(i)配列の特徴:

- (A)長さ:16塩基対
- (B)型:核酸
- (C)鎖の数:一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号37：

GTACATGGTA GCAATG

16

(2)配列番号38の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：40塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号38：

AACTGTCCAT GTACCATCGT TACTGCCATA ATCTCGGATC

40

(2)配列番号39の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：31塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号39：

TAAATTTAAT ATATCGATTA CATGTACCAT C

31

(2)配列番号40の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：16塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号40：

GTACATGGTA GCAATG

16

(2)配列番号41の情報：

(i)配列の特徴：

- (A)長さ：40塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号4 1：

AACTGTCCAT GTACCATCGT TACTGCCATA ATCTCGGATC 40

(2)配列番号4 2の情報：

(i)配列の特徴：

- (A)長さ：23塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号4 2：

ATGTACCATC GTTACTGCCA TAA 23

(2)配列番号4 3の情報：

(i)配列の特徴：

- (A)長さ：23塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号4 3：

TACATGCTAG CAATGACGGT ATT 23

(2)配列番号4 4の情報：

(i)配列の特徴：

- (A)長さ：40塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号4 4：

AACTGTCCAT GTACCATCGT TACTGCCATA ATCTCGGATC

40

## (2) 配列番号 4 5 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 22塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号 4 5 :

TACCATCGTT ACTGCCATAA TC

22

## (2) 配列番号 4 6 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 40塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号 4 6 :

TTGACAGGTA CATGGTAGCA ATGACGGTAT TAGAGCCTAG

40

## (2) 配列番号 4 7 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 40塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号 4 7 :

AACTGTCCAT GTACCATCGT TACTGCCATA ATCTCGGATC

40

## (2) 配列番号 4 8 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 22塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号48：

GTTACTGCCA TAATCTCGGA TC

22

(2)配列番号49の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：40塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号49：

TTGACAGGTA CATGGTAGCA ATGACGGTAT TAGAGCCTAG

40

(2)配列番号50の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：40塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

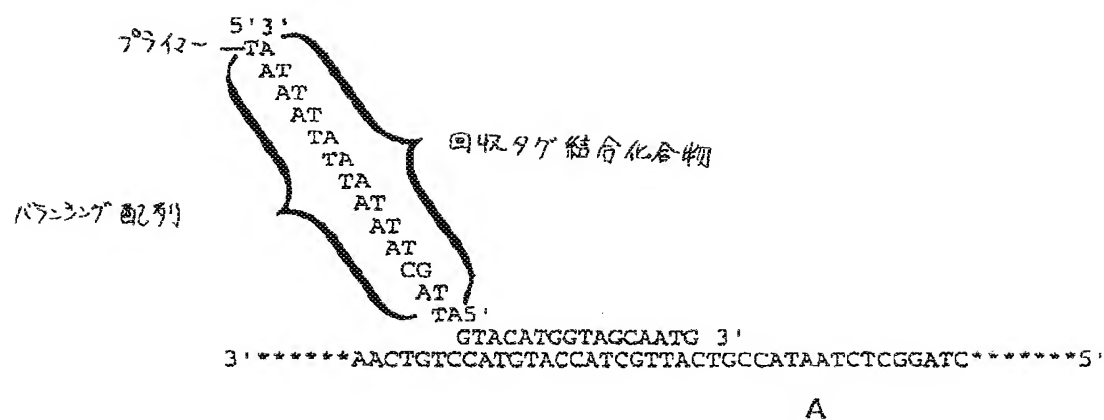
(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号50：

AACTGTCCAT GTACCATCGT TACTGCCATA ATCTCGGATC

40

【図1A】



【図1】

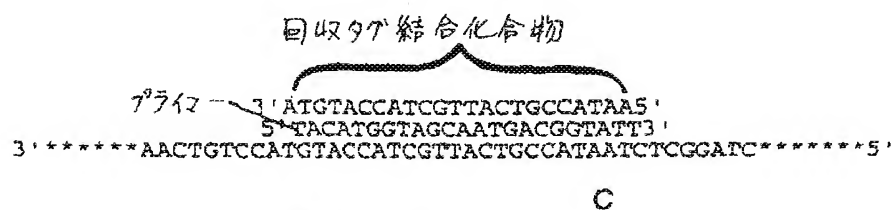
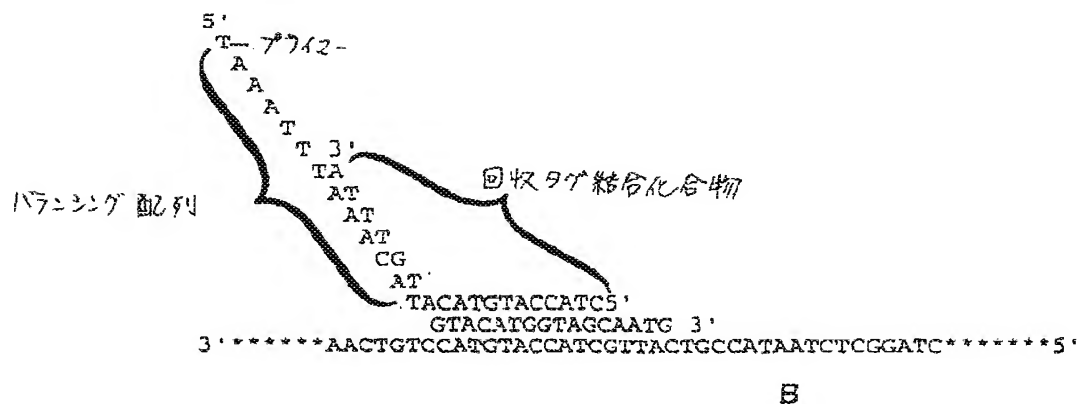


Fig. 1

【図1】

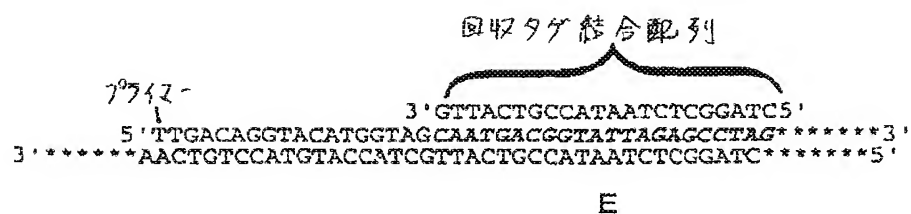
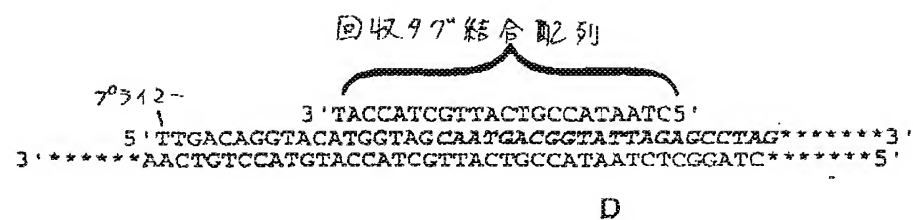


Fig. 1 ( 続き )

【图2】

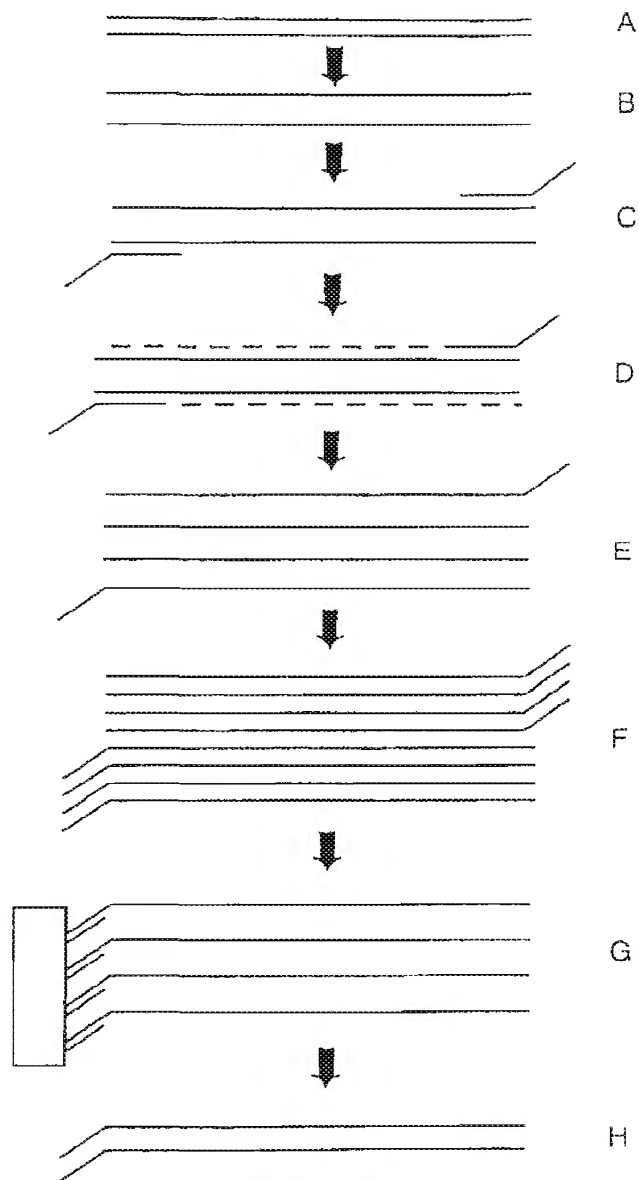


Fig. 2



【図3】

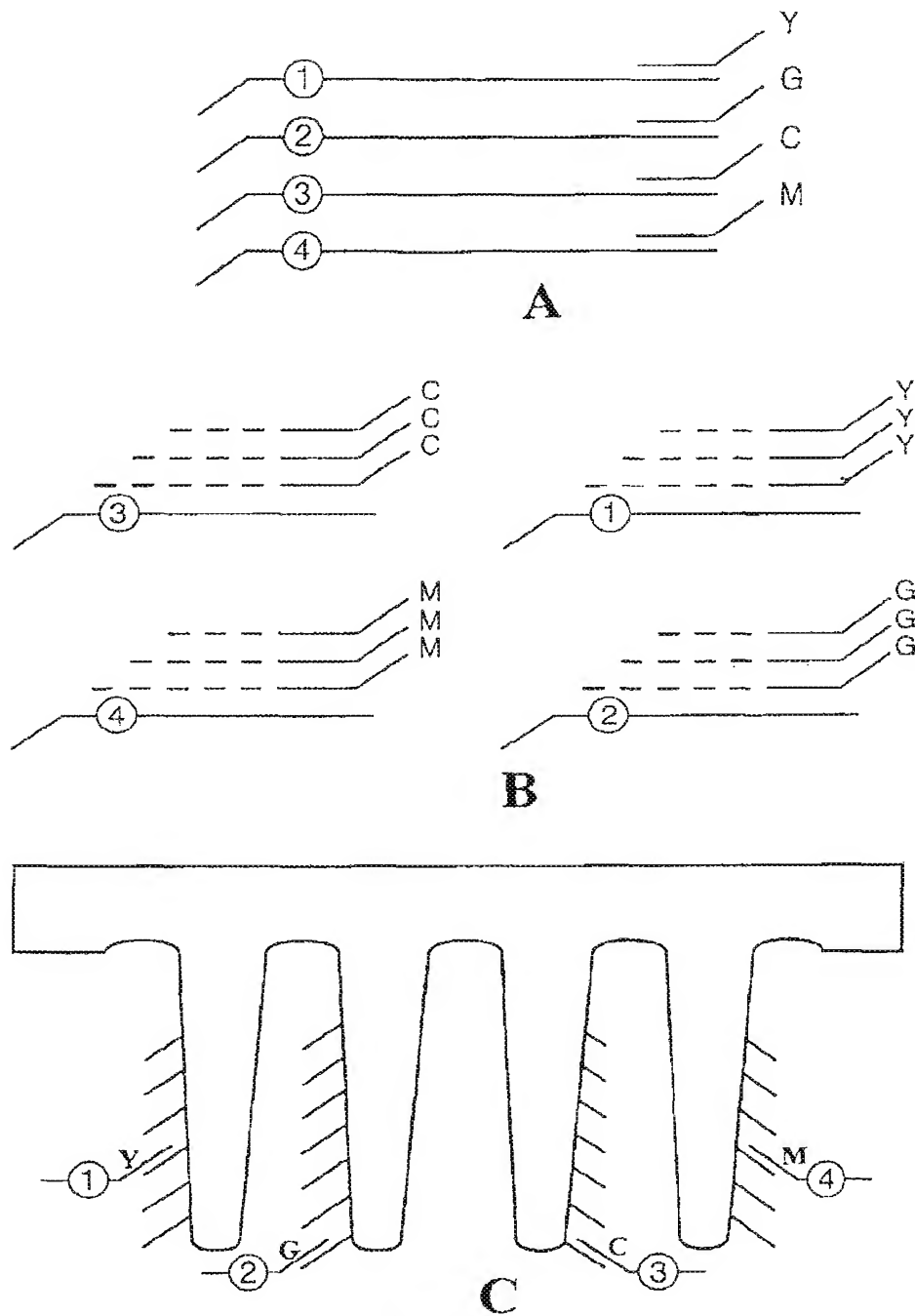


Fig. 3

【図4】

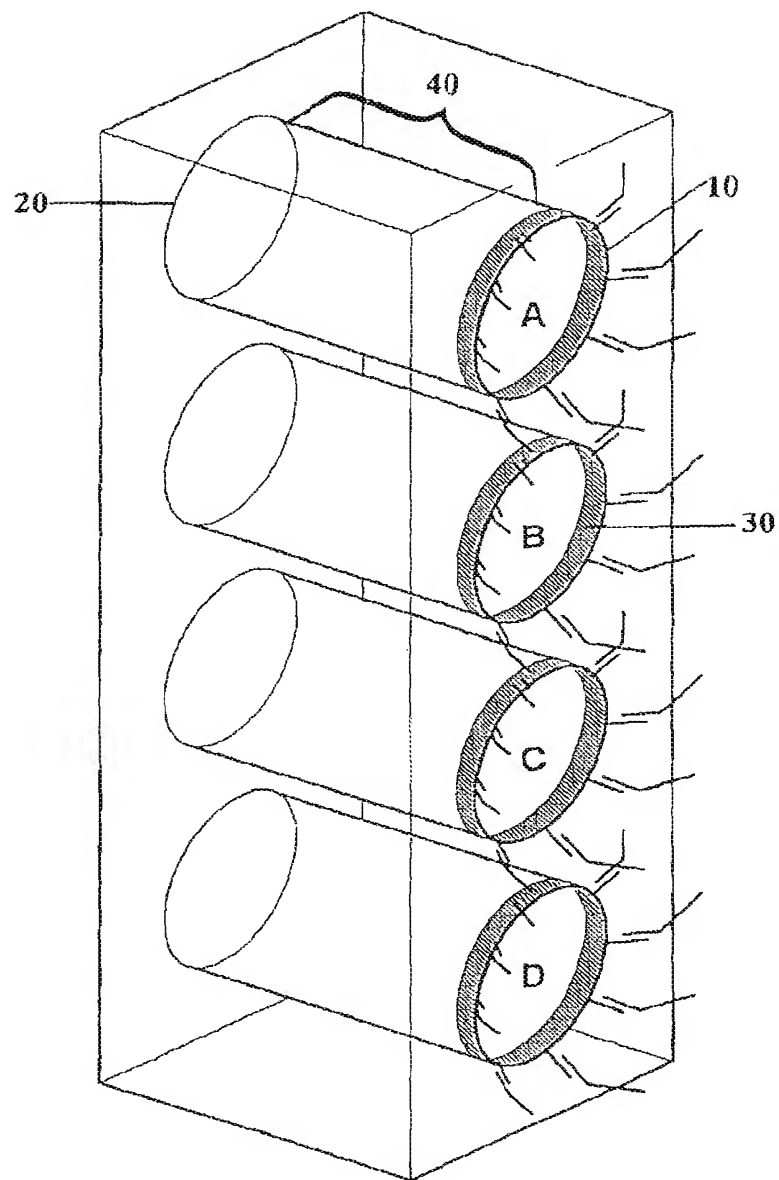


Fig. 4

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12Q1/68		International Application No. PCT/US 97/17705
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 416 817 A (ICI PLC) 13 March 1991	1, 13, 14, 20, 22-24, 28, 31, 35-40, 43, 45, 48
Y	see the whole document	2-11, 13-16, 18-24, 26-28, 30, 31, 33-41, 44-51
--- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 February 1998		Date of mailing of the international search report 11/03/1998
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 LV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Ex. 31 851 apo ds, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer: Knehr, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 97/17705

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 02634 A (UNIV SOUTH AUSTRALIA ;ADELAIDE CHILDREN'S HOSPITAL (AU); HARRIS RA) 3 February 1994	52
Y	see the whole document	2-11, 13-16, 18-24, 26-28, 30,31, 33-41, 44-51
X	US 5 149 625 A (CHURCH GEORGE M ET AL) 22 September 1992	52
Y	cited in the application see abstract	1,3, 5-11, 14-20, 22-25, 27,28, 31, 35-38, 41,43, 45,46, 48-51
Y	GADE R ET AL.: "Incorporation of nonbase residues into synthetic oligonucleotides and their use in the PCR" GENETIC ANALYSIS TECHNIQUES AND APPLICATIONS, vol. 10, no. 2, 1993, pages 61-65, XP002056677	1,3, 5-11, 14-20, 22-25, 27,28, 31, 35-38, 41,43, 45,46, 48-51
	see abstract	
X	US 5 200 314 A (URDEA MICHAEL) 6 April 1993	52
Y	see the whole document	1-8,10, 11, 13-24, 27,28, 30-32, 35-45, 47-51
Y	WO 95 35505 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 28 December 1995	1-8,10, 11, 13-24, 27,28, 30-32, 35-45, 47-51
	see the whole document	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 97/17705

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 94 21820 A (HOPE CITY ; WALLACE ROBERT BRUCE (US)) 29 September 1994  see the whole document ---	1, 5, 6, 10-12, 15, 16, 18, 20, 22, 23, 25, 27-29, 35-39, 43-50
Y	WO 94 11529 A (PHARMACIA LKB BIOTECH ; LANDEGREN ULF (SE)) 26 May 1994  see the whole document -----	1, 5, 6, 10-12, 15, 16, 18, 20, 22, 23, 25, 27-29, 35-39, 43-50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 97/17705

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0416817 A	13-03-91	AT 144290 T	15-11-96
		AU 622349 B	02-04-92
		AU 6118490 A	14-03-91
		DE 69028891 D	21-11-96
		DE 69028891 T	13-03-97
		GB 2235689 A, 8	13-03-91
		JP 3272686 A	04-12-91
		US 5525494 A	11-06-96
WO 9402634 A	03-02-94	AU 4551193 A	14-02-94
		CA 2140877 A	03-02-94
		EP 0656068 A	07-06-95
US 5149625 A	22-09-92	US 4942124 A	17-07-90
		EP 0303459 A	15-02-89
		JP 1137982 A	30-05-89
		JP 2665775 B	22-10-97
US 5200314 A	06-04-93	EP 0521111 A	07-01-93
		WO 9114788 A	03-10-91
WO 9535505 A	28-12-95	AU 2862995 A	15-01-96
		CA 2192095 A	28-12-95
		EP 0804731 A	05-11-97
WO 9421820 A	29-09-94	AU 3933393 A	11-10-94
WO 9411529 A	26-05-94	EP 0672189 A	20-09-95
		JP 8503133 T	09-04-96
		US 5618701 A	08-04-97

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 チェン, ジャー—カン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94303,  
パロ アルト, エイムズ アベニュー  
882

(72)発明者 チェサ, クラウディア  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404,  
フォスター シティ, ビーチ パーク  
ブルバード ナンバー107 1441

(72)発明者 フライ, ジョージ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070,  
サン カルロス, ダートマウス 733

【要約の続き】

同時に生成したオリゴヌクレオチド増幅産物を分離するのに容易に適応し得る。発明の他の局面は、複数のポリヌクレオチド配列決定ラダーまたは増幅産物の生成または回収用のキットである。キットはユニークな回収タグをもつ回収可能な複数のプライマーを含む。好ましくは、回収タグは、適切な回収タグ結合化合物、すなわちプライマーが結合セットを含むプライマーに結合した時に、同じ変性温度を十分にもつポリヌクレオチドである。キットはさらに回収タブ(tap)結合化合物を含む。キットはまたさらに標識した鎖ターミネーターを含む。本発明の他の局面はポリヌクレオチド回収デバイスを含む。